

**Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Vorstand: Prof. Dr. Thomas Gudermann

**Charakterisierung cAMP-unabhängiger
Effektoren des Thyreotropin-Rezeptors in
humanen Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Stefanie Stohr

aus Gießen

München 2013

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Betreuer: PD Dr. med. Dr. rer. nat. Harald Mückter

Zweitgutachter: Prof. Dr. Horst Zitzelsberger

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 24.06.2014

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	1
2 Summary	3
3 Einleitung	5
3.1 Die Schilddrüse	5
3.1.1 Funktion und Bedeutung.....	5
3.1.2 Hormone	6
3.1.3 Regulation (Hypothalamus-Hypophyse Regelkreislauf)	7
3.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.....	9
3.2.1 Struktur	9
3.2.2 Interaktion des GPCR mit G-Proteinen	10
3.2.2.1 $G\alpha_s$ -Familie.....	12
3.2.2.2 $G\alpha_{i/o}$ -Familie.....	12
3.2.2.3 $G\alpha_{q/11}$ -Familie	12
3.2.2.4 $G\alpha_{12/13}$ -Familie.....	13
3.2.2.5 $\beta\gamma$ -Komplex	13
3.3 Der humane TSH-R.....	14
3.3.1 Expression.....	14
3.3.2 Struktur	14
3.3.3 TSH-R-induzierte Signalwege.....	17
3.3.4 Pathophysiologie des TSH-R.....	19
3.3.4.1 Morbus Basedow, Immunhyperthyreose	19
3.3.4.2 Autoimmunhypothyreose	19
3.3.4.3 Benigne Schilddrüsenknoten	20
3.4 Schilddrüsenkarzinome	20
3.4.1 Epidemiologie und medizinische Bedeutung	20
3.4.1.1 Papilläre Schilddrüsenkarzinome	21
3.4.1.2 Follikuläre Schilddrüsenkarzinome	21
3.4.1.3 Medulläre Schilddrüsenkarzinome	21
3.4.1.4 Anaplastische und gering differenzierte Schilddrüsenkarzinome	22
3.4.2 Molekulare Grundlagen	22

Inhaltsverzeichnis

3.4.3 Rolle des TSH-R in Schilddrüsenkarzinomen	23
3.5 Der Transkriptionsfaktor NFAT	25
3.5.1 Struktur.....	26
3.5.2 Aktivierungsmechanismus	27
3.5.3 Interaktion von NFAT mit anderen Transkriptionsfaktoren	30
3.5.4 Rolle in Karzinomen	30
3.5.5 Zielgene.....	31
3.5.5.1 c-Myc	32
3.5.5.2 Regulator von Calcineurin 1	32
3.5.5.3 Cyclooxygenase 2	34
3.6 Metallothioneine	35
3.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	36
4 Material und Methoden.....	39
4.1 Material	39
4.1.1 Geräte	39
4.1.2 Verbrauchsmaterialien	41
4.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Versuchskits	41
4.1.4 Zellkultur.....	44
4.1.4.1 Zellkulturmedien.....	44
4.1.4.2 Zelllinien	44
4.1.5 Primer	45
4.1.6 Antikörper	46
4.1.6.1 Primärantikörper	46
4.1.6.2 Sekundärantikörper, Meerrettich Peroxidase-gekoppelt.....	47
4.1.6.3 Sekundärantikörper, Fluoreszenz-gekoppelt.....	47
4.1.7 siRNA.....	47
4.1.8 Vektoren/Plasmide	48
4.1.9 Lösungen und Puffer	48
4.1.9.1 Standardlösungen und Puffer	48
4.1.9.2 Lösungen und Puffer für proteinbiochemische Methoden.....	49
4.1.9.3 Lösungen und Puffer für molekularbiologische Methoden	50
4.1.9.4 Lösungen und Puffer für spezielle Messmethoden und Versuche	50
4.2 Allgemeine Methoden.....	51
4.2.1 Zellkultur.....	51
4.2.1.1 Kultivierung der Zellen.....	51

Inhaltsverzeichnis

4.2.1.2	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	53
4.2.1.3	Beschichtung von Zellkulturplatten mit Poly-L-Lysin.....	54
4.2.1.4	Transfektionen	54
4.3	Proteinchemische Methoden	57
4.3.1	Western Blot	57
4.3.1.1	Generierung von Proteinlysaten	57
4.3.1.2	SDS-PAGE	58
4.3.1.3	Elektrotransfer der Proteine auf eine Membran.....	59
4.3.1.4	Immunfärbung	60
4.3.2	Immunzytochemische Analysen.....	62
4.4	Molekularbiologische Methoden	63
4.4.1	RNA-Isolierung aus Zelllysaten	63
4.4.2	cDNA-Synthese	65
4.4.3	Quantitative PCR	66
4.5	Spezielle Messmethoden und Versuche.....	69
4.5.1	Bestimmung der intrazellulären Calciumionenkonzentration einer Zellpopulation mittels Fura-2/AM.....	69
4.5.2	Bestimmung des Calciumioneneinstroms in Einzelzellen mittels Fura-2/AM (Mangan-, „Quench“)	71
4.5.3	NFAT-Reportergenstudie	73
4.5.4	Kerntranslokation eines NFAT-eGFP Fusionsproteins	76
4.5.5	Bestimmung der Zellproliferation mittels XTT	77
4.5.6	Untersuchung der Koloniebildung.....	79
4.5.7	Boyden-Chamber Migrationstest.....	81
4.5.8	Messung der cAMP-Akkumulation.....	83
4.6	Auswertung und Statistik	84
5	Ergebnisse	85
5.1	Funktioneller Nachweis des humanen TSH-Rezeptors in follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien	85
5.1.1	Analyse der TSH-abhängigen cAMP-Bildung in follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien.....	85
5.1.2	Analyse der TSH-abhängigen ERK 1/2-Aktivierung in follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien.....	86
5.1.3	Analyse der TSH-abhängigen Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration in follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien.....	88

5.2 TSH-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT in FTC 133 wt TSH-R Zellen	90
5.2.1 Expression der Calcineurin-abhängigen NFAT-Varianten auf mRNA-Ebene in FTC 133 wt TSH-R Zellen.....	91
5.2.2 Expression der Calcineurin-abhängigen NFAT-Varianten auf Proteinebene in FTC 133 wt TSH-R Zellen.....	92
5.2.3 Subzelluläre Lokalisation endogener NFAT Proteine in FTC 133 wt TSH-R Zellen.....	93
5.2.4 Subzelluläre Lokalisation des NFATc3-eGFP Fusionsproteins nach TSH-Stimulation in FTC 133 wt TSH-R Zellen.....	96
5.2.5 TSH-induzierte Expression eines NFAT-abhängigen Reportergenkonstrukts in FTC 133 wt TSH-R Zellen.....	98
5.3 TSH-induzierte Expression NFAT-abhängiger Zielgene in follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien.....	99
5.3.1 TSH-induzierte Autotaxin Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen.....	99
5.3.2 TSH-induzierte VEGF Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen.....	100
5.3.3 TSH-induzierte c-Myc Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen.....	101
5.3.3.1 Analyse einer Calcineurin/NFAT-Aktivierung bei der TSH-induzierten c-Myc Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen	102
5.3.3.2 Analyse einer MAPK-Aktivierung bei der TSH-induzierten c-Myc Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen.....	103
5.3.4 TSH-induzierte RCAN1 Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen.....	104
5.3.4.1 TSH-induzierte Expression von RCAN1 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen	104
5.3.4.2 TSH-induzierte mRNA-Expression der RCAN1-Isoformen RCAN1.1 und RCAN1.4 in FTC 133 wt TSH-R Zellen	105
5.3.4.3 TSH-induzierte Expression des Proteins RCAN1 in FTC 133 wt TSH-R Zellen	106
5.3.4.4 Analyse einer Calcineurin/NFAT-Aktivierung bei der TSH-induzierten RCAN1 Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen.....	107
5.3.4.5 Rolle der G-Protein-Aktivierung bei der TSH-induzierten RCAN1 Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen.....	110
5.3.4.6 Einfluss von Calciumionen auf die TSH-induzierte RCAN1-Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen	119
5.3.4.7 Analyse von Cofaktoren für NFAT bei der TSH-induzierten RCAN1 Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen.....	126
5.3.4.8 Funktionelle Analysen zur TSH-induzierten RCAN1 Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen.....	130
5.3.5 TSH-induzierte RCAN1 Expression in RO82-W-1 Zellen.....	137
5.3.5.1 TSH-induzierte Expression von RCAN1 mRNA in RO82-W-1 Zellen	137

Inhaltsverzeichnis

5.3.5.2	TSH-induzierte mRNA-Expression der RCAN1-Isoformen RCAN1.1 und RCAN1.4 in RO82-W-1 Zellen.....	138
5.3.5.3	TSH-induzierte Expression des Proteins RCAN1 in RO82-W-1 Zellen.....	139
5.3.5.4	Analyse einer Calcineurin/NFAT-Aktivierung bei der TSH-induzierten RCAN1 Expression in RO82-W-1 Zellen.....	139
5.3.5.5	Rolle der G-Protein-Aktivierung bei der TSH-induzierten RCAN1 Expression in RO82-W-1 Zellen.....	141
5.3.5.6	Funktionelle Analysen zur TSH-induzierten RCAN1 Expression in RO82-W-1 Zellen.....	144
5.3.5.7	Expression der TSH-R mRNA in follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien.....	146
5.3.6	TSH-induzierte Cox-2 Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen.....	147
5.3.6.1	TSH-induzierte Expression von Cox-2 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen.....	147
5.3.6.2	TSH-induzierte Expression des Proteins Cox-2 in FTC 133 wt TSH-R Zellen.....	148
5.3.6.3	Analyse einer Calcineurin/NFAT-Aktivierung bei der TSH-induzierten Cox-2 Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen.....	149
5.3.6.4	Rolle der G-Protein-Aktivierung bei der TSH-induzierten Cox-2 Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen.....	152
5.3.6.5	Analyse von Cofaktoren für NFAT bei der TSH-induzierten Expression von Cox-2 in FTC 133 wt TSH-R Zellen.....	154
5.4	TSH-induzierte MT1X Expression in follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien und primären Thyrozyten.....	155
5.4.1	TSH-induzierte Expression von MT1X mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen.....	156
5.4.2	Untersuchungen zur Signaltransduktionskaskade der TSH-induzierten MT1X Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen.....	157
5.4.2.1	Rolle der G _{q/11} -Protein-Aktivierung bei der TSH-induzierten MT1X Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen.....	157
5.4.2.2	Rolle der G _s -Protein-Aktivierung bei der TSH-induzierten MT1X Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen.....	161
5.4.2.3	Analyse einer MAPK-Aktivierung bei der TSH-induzierten MT1X Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen.....	163
5.4.3	TSH-induzierte Expression von MT1X mRNA in primären Thyrozyten..	164
5.4.3.1	Rolle der PKC bei der TSH-induzierten MT1X Expression in primären Thyrozyten.....	165
6	Diskussion	167
6.1	G _{q/11} -abhängige Signalwege des humanen TSH-R.....	167

Inhaltsverzeichnis

6.2 Auswahl der Zellmodelle.....	169
6.3 TSH-vermittelte NFAT-Aktivierung.....	172
6.3.1 Expression des Transkriptionsfaktors NFAT sowie dessen TSH-abhängige Aktivierung in FTC 133 wt TSH-R Zellen	172
6.3.2 Die Rolle von G _{q/11} -Proteinen bei der TSH-vermittelten NFAT-Aktivierung in FTC 133 wt TSH-R Zellen.....	174
6.3.3 Die Rolle von Calciumionen bei der TSH-vermittelten NFAT-Aktivierung in FTC 133 wt TSH-R Zellen.....	175
6.3.4 TSH-induzierte Expression NFAT-abhängiger Zielgene in FTC 133 wt TSH-R Zellen.....	177
6.3.4.1 TSH-induzierte RCAN1 Expression.....	177
6.3.4.2 TSH-induzierte Cox-2 Expression.....	183
6.4 TSH-induzierte Metallothionein 1 Expression	188
7 Literaturverzeichnis.....	193
8 Anhang	I
Abbildungsverzeichnis.....	I
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Aminosäurenverzeichnis.....	XIII
Publikationsverzeichnis	XV
Eidesstattliche Versicherung.....	XVII
Danksagung.....	XIX

1 Zusammenfassung

Der humane Thyreotropin-Rezeptor (TSH-R) steuert die zentralen Funktionen der Schilddrüse und ist der wichtigste Regulator für deren Wachstum und Differenzierung. Er gehört zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und kann nach einer Stimulation mit TSH die G-Proteine aller vier Familien (G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$ und $G_{12/13}$) aktivieren. Dabei werden die meisten zellulären Reaktionen wie die Proliferation der Schilddrüsenepithelzellen und die Bereitstellung der Schilddrüsenhormone einer Aktivierung von G_s zugeordnet. Zu G_s -unabhängigen Signalwegen des TSH-R war dagegen erst wenig bekannt. Da der $G_{q/11}$ -vermittelte Signalweg durch die Aktivierung der Phospholipase C und Proteinkinase C in maligne Prozesse von Schilddrüsenzellen involviert sein könnte, sollten in der vorliegenden Arbeit $G_{q/11}$ -abhängige Effektoren des TSH-R in humanen Schilddrüsenkarzinomzellen identifiziert und näher charakterisiert werden.

Als Modellsystem wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen verwendet, eine follikuläre Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie, die den humanen TSH-R überexprimiert. In diesen wurde die Aktivierung des Calcium/Calcineurin-abhängigen Transkriptionsfaktors NFAT nach TSH-Stimulation erstmalig beschrieben. Bei einer anschließenden Reihenuntersuchung der NFAT-abhängigen Zielgene Autotaxin, VEGF, c-Myc, Regulator von Calcineurin 1 (RCAN1) und Cyclooxygenase-2 (Cox-2) wurden c-Myc, RCAN1 und Cox-2 als TSH-regulierte Gene identifiziert. Die Induktion von c-Myc war unabhängig von NFAT, dagegen bestätigten Expressionsstudien mit Calcineurin-Inhibitoren und dem spezifischen NFAT-Inhibitor INCA-6, dass RCAN1 und Cox-2 durch eine NFAT-Aktivierung induziert wurden. Diese Aktivierung wurde durch $G_{q/11}$ -Proteine vermittelt, denn nach spezifischer Herunterregulation der G_q - und G_{11} - α -Untereinheiten mittels siRNA konnten die Zielgene nicht mehr TSH-abhängig induziert werden. Weitere Analysen zum Mechanismus der NFAT-Aktivierung zeigten, dass eine Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) allein über intrazelluläre Speicher nicht ausreichend war. Um NFAT zu aktivieren, mussten zusätzlich Calciumionen aus dem Extrazellulärraum einströmen. Untersuchungen mit dem STIM1-Inhibitor SKF-96365 wiesen dabei auf einen Calciumioneneinstrom über Speicher-operierte Ionenkanäle hin.

Zusätzlich zur NFAT-regulierten Genexpression wurde in dieser Arbeit die TSH-induzierte Expression des Metallothioneins MT1X in FTC 133 wt TSH-R Zellen und in primären Thyreozyten analysiert. Die mRNA Induktion dieses Cystein-reichen und zytoprotektiven Proteins war ebenfalls abhängig von einer Expression der $G_{q/11}$ -Proteine. Eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ reichte jedoch nicht aus, um MT1X

signifikant zu induzieren. Zur gesteigerten Expression war darüber hinaus auch die Aktivierung der Proteinkinase C notwendig.

In der vorliegenden Dissertation konnten somit RCAN1, Cox-2 und MT1X als $G_{q/11}$ -regulierte Zielgene des humanen TSH-R charakterisiert werden. Dabei wurde eine NFAT-regulierte Genexpression nach einer TSH-Stimulation erstmalig gezeigt. Die präsentierten Ergebnisse weisen damit auf eine bisher unbeachtete biologische Rolle von $G_{q/11}$ -abhängigen Signalwegen des humanen TSH-R in der Schilddrüse hin.

2 Summary

The human thyrotropin receptor (TSH-R) controls main functions of the thyroid gland and is the most important regulator of its growth and differentiation. The TSH-R belongs to the superfamily of G protein-coupled receptors (GPCR). After stimulation with TSH, it activates G proteins of all four families (G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$ and $G_{12/13}$). So far, most cellular reactions, e. g. growth of follicular epithelial cells or supply of thyroid hormones, have been attributed to G_s activation. G_s -independent signalling however was largely unknown. Because $G_{q/11}$ -dependent signalling by activating phospholipase C (PLC) and protein kinase C (PKC) may be involved in malignant processes of follicular epithelial cells, the aim of the present investigation was to identify and characterise $G_{q/11}$ -regulated effectors of TSH-R.

In order to do so, the follicular thyroid cancer cell line FTC 133 wt TSH-R, which overexpresses human TSH-R, was used as a model system. In these cells, activation of the calcium/calcineurin-dependent transcription factor NFAT after TSH stimulation was described for the first time. A subsequent analysis of the putative NFAT-dependent target genes autotaxin, VEGF, c-Myc, Regulator of Calcineurin 1 (RCAN1), and Cyclooxygenase 2 (Cox-2) identified TSH-induced expression of c-Myc, RCAN1, and Cox-2. Studies with calcineurin inhibitors and the specific NFAT inhibitor INCA-6 revealed that induction of c-Myc was independent of NFAT, whereas increased expression of RCAN1 and Cox-2 by TSH depended on NFAT. Furthermore, TSH-dependent NFAT activation was mediated by $G_{q/11}$ proteins, since a specific siRNA knockdown of G_q and G_{11} α -subunits prevented induction of the target genes by TSH. Analysis of the mechanism leading to TSH-induced NFAT activation revealed, that an increase of intracellular calcium ion concentration ($[Ca^{2+}]_i$) by internal stores alone was not sufficient to activate NFAT but required an additional influx of extracellular calcium ions. Investigations with STIM1 inhibitor SKF-96365 indicated an influx through store-operated calcium channels.

In addition to NFAT-regulated gene expression, TSH-induced expression of metallothionein MT1X was analyzed in the present work. mRNA induction of this cystein-rich and cytoprotective protein was also dependent on $G_{q/11}$ -proteins, but elevation of $[Ca^{2+}]_i$ was not sufficient to induce MT1X significantly. Moreover, activation of protein kinase C (PKC) was required for increased MT1X expression.

In conclusion, RCAN1, Cox-2 and MT1X were determined as $G_{q/11}$ -dependent target genes of human TSH-R in a suitable cell model of the thyroid gland. Furthermore, NFAT-dependent gene expression as a result of TSH stimulation was

Summary

shown for the first time. These interesting new data point to a so far unappreciated biological role on $G_{q/11}$ -dependent TSH-R signalling in the thyroid.

3 Einleitung

3.1 Die Schilddrüse

3.1.1 Funktion und Bedeutung

Die Schilddrüse (*Glandula thyroidea*) ist eine endokrine Drüse, die über ihre Hormone den Energiestoffwechsel fast aller Zellen reguliert. Im gesunden Zustand ist die Schilddrüse beim Mann etwa 18-25 ml und bei der Frau etwa 15-20 ml groß (Löffler et al. 2007). Die Anatomie der humanen Schilddrüse ist in Abb. 3.1 aufgezeigt.

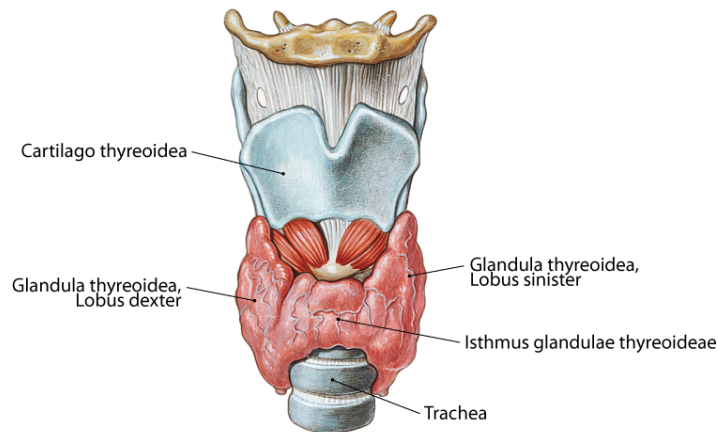


Abb. 3.1: Anatomie der humanen Schilddrüse

Die humane Schilddrüse (*Glandula thyroidea*) befindet sich am Hals unterhalb des Kehlkopfes (*Cartilago thyroidea*) vor der Luftröhre (*Trachea*). Sie besteht aus zwei Lappen (*Lobus dexter* und *Lobus sinister*), die über einen schmalen Streifen (*Isthmus*) miteinander verbunden sind. Abbildung modifiziert nach Paulsen (Paulsen et al. 2010).

Histologisch besteht die Schilddrüse aus Schilddrüsenfollikeln. Diese werden von Follikelepithelzellen (Thyreozyten) gebildet, die mit stark ausgeprägten „tight junctions“ das sog. Kolloid wabenartig in einem einschichtigen Zellverband umschließen (siehe Abb. 3.2). Der Hauptbestandteil dieses Kolloids ist Thyreoglobulin (Tg), ein gelöstes globuläres Glykoprotein, das die von den Follikelepithelzellen gebildeten Schilddrüsenhormone Thyroxin (T_4) sowie Triiodthyronin (T_3) in gebundener Form zur Speicherung enthält. Zwischen den Schilddrüsenfollikeln befinden sich die parafollikulären C-Zellen. Diese bilden das Hormon Calcitonin, das den Calciumionenspiegel im Blut senkt und so den Gegenspieler zu dem in den Nebenschilddrüsen gebildeten Parathormon darstellt. Die zentrale Rolle der Schilddrüse ist jedoch die Synthese und Speicherung der eigentlichen Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 sowie deren Sekretion in den Blutkreislauf.

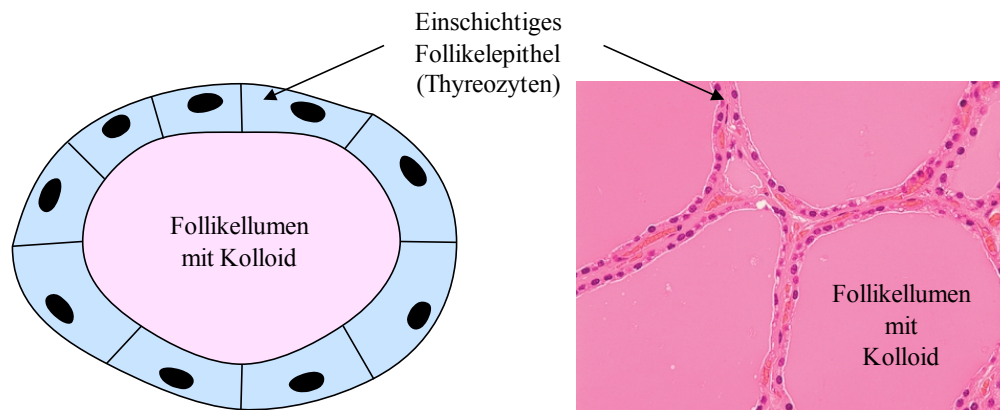


Abb. 3.2: Schilddrüsenfollikel

Schematische Darstellung eines Schilddrüsenfollikels *in vivo* (links) sowie Histologie der Schilddrüse mit mehreren Schilddrüsenfollikeln (rechts). Das Follikellumen wird von den Follikelepithelzellen (Thyreozyten) gebildet und ist Kolloid gefüllt. Abbildung modifiziert nach Toda (Toda et al. 2011).

3.1.2 Hormone

Für die Biosynthese der lebenswichtigen Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 ist neben der Synthese und apikalen Sekretion des Tg eine ausreichende Versorgung mit dem Spurenelement Iodid nötig. Dieses wird über den Natrium-Iodid-Symporter (NIS) aus dem Serum in die Thyreozyten transportiert und in das Kolloid abgegeben. Bei der Biosynthese von T_3 und T_4 werden im ersten Schritt ausgewählte Tyrosylreste iodiert. Dies erfolgt in einer zweistufigen Reaktion, wobei das Iodid zuerst mittels H_2O_2 durch das Enzym Thyreooxidase oxidiert wird. Anschließend erfolgt die Iodierung der Tyrosylreste, die durch das Enzym Thyreoperoxidase (TPO) katalysiert wird. Zur Sekretion der Schilddrüsenhormone wird Tg anschließend über Mikropinozytose in die Thyreozyten aufgenommen und in den Lysosomen abgebaut. Die so entstandenen Tg-Fragmente werden durch Dipeptidyl-Peptidasen sowie Exopeptidasen weiter gespalten, wodurch T_3 und T_4 freigesetzt werden. Diese werden nun, vermutlich über spezifische Transporter, an den Extrazellulärraum sowie die Blutbahn abgegeben.

Von der Schilddrüse wird vor allem T_4 synthetisiert, das nur mit geringer Affinität an Thyroidhormonrezeptoren binden kann (Samuels et al. 1973; Oppenheimer et al. 1974). Das metabolisch aktive T_3 wird von den Thyreozyten bei ausreichender Iodversorgung dagegen in nur geringem Ausmaß erzeugt und stattdessen im peripheren Gewebe, katalysiert durch eine Deiodase, aus T_4 gebildet.

Die Schilddrüsenhormone erhöhen den Grundumsatz des Körpers: durch den gesteigerten Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinstoffwechsel steigen im gesamten Organismus O_2 -Verbrauch und Wärmeproduktion. Bei mangelnder Versorgung des Körpers mit Schilddrüsenhormonen ist der Stoffwechsel verlangsamt, wodurch körperliche und geistige Leistungsfähigkeit vermindert werden. Die übermäßige Produktion von Schild-

drüsenhormonen führt dagegen zu einem erhöhten Energieverbrauch, der gesteigerte Grundumsatz belastet den Kreislauf und führt zu Symptomen wie starker Schweißproduktion, beschleunigtem Herzschlag, Gewichtsverlust und Nervosität.

3.1.3 Regulation (Hypothalamus-Hypophyse Regelkreislauf)

Die Funktion der Schilddrüse wird vorwiegend über das Hormon Thyreotropin (TSH, Thyreoidea-stimulierendes Hormon) und dessen spezifischen Rezeptor, den G-Protein-gekoppelten TSH-Rezeptor (TSH-R), kontrolliert (Vassart et al. 1992). Wenn TSH an den von Thyreozyten exprimierten Rezeptor bindet und ihn dadurch aktiviert, wird das Zellwachstum der Follikelepithelzellen stimuliert. Außerdem werden Iodaufnahme sowie Synthese und Sekretion der Schilddrüsenhormone angeregt (Dumont et al. 1992; Vassart et al. 1992). TSH ist ein glandotropes (auf Drüsen wirkendes) Glykoprotein aus den basophilen Zellen der Adenohypophyse. Es hat eine Molekülmasse von 28 kDa und besteht aus einer α - sowie einer β -Untereinheit, die über Disulfidbrücken verbunden sind (Abb. 3.3). Die α -Untereinheit ist aus 99 Aminosäuren zusammengesetzt und ist identisch mit derjenigen der Gonadotropine Follicotropin (FSH, Follikelstimulierendes Hormon), Luteotropin (LH) sowie dem humanen Choriongonadotropin (hCG) (Sairam et al. 1977; Fiddes et al. 1981). Die β -Untereinheit ist Hormon-spezifisch und enthält beim Menschen 112 Aminosäuren (Sairam et al. 1977; Hayashizaki et al. 1985). Neben der Funktion der Schilddrüse reguliert TSH in der Peripherie die Umwandlung von T_4 in T_3 und fördert die Freisetzung von Lipiden im Fettgewebe.

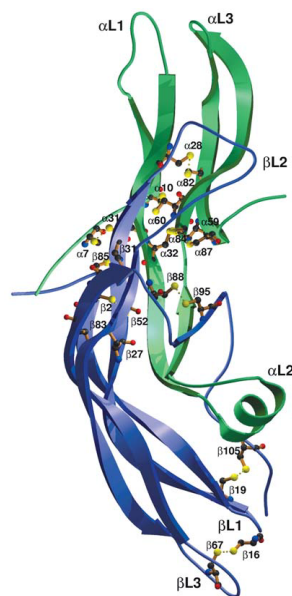


Abb. 3.3: Strukturmodell des humanen Thyreotropins (TSH)

Die α -Untereinheit ist in grün, die β -Untereinheit in blau dargestellt. Positionen der Disulfidbrücken sind als punktierte Linie zwischen gelben Kugeln eingezeichnet. Abbildung nach Nuñez Miguel (Núñez Miguel et al. 2004).

Die Synthese und Sekretion von TSH wird über einen thyreotropen Regelkreis gesteuert (Abb. 3.4), in dem der Hypothalamus mit seinem Freisetzungshormon Thyreoliberin (engl.: „Thyreotropin Releasing Hormone“, TRH) das oberste Steuerungselement bildet (Nillni 2010). TRH wird überwiegend in Neuronen des parvozellulären Anteils des *Nucleus paraventricularis* synthetisiert (Segerson et al. 1987a; Segerson et al. 1987b) und in deren Axonen zur *Eminentia mediana* transportiert (Ishikawa et al. 1988). Hier wird TRH gespeichert und sezerniert, wodurch es über das Hypophysen-Pfortader-System zu seinen Rezeptoren an den basophilen Zellen der Adenohypophyse gelangt. Durch die Aktivierung des TRH-spezifischen Rezeptors wird die Synthese und Sekretion des TSH in den Blutkreislauf stimuliert (Hall et al. 1970; Harris et al. 1978), von wo aus TSH die Schilddrüse erreicht. Hier bindet es an den TSH-R, durch dessen Aktivierung unter anderem die Sekretion von T_3 und T_4 ausgelöst wird (siehe oben). T_3 und T_4 wiederum hemmen über einen negativen Rückkopplungsmechanismus die Bereitstellung von TRH im Hypothalamus (Koller et al. 1987; Segerson et al. 1987b) und von TSH in der Adenohypophyse (Franklyn et al. 1987; Mirell et al. 1987).

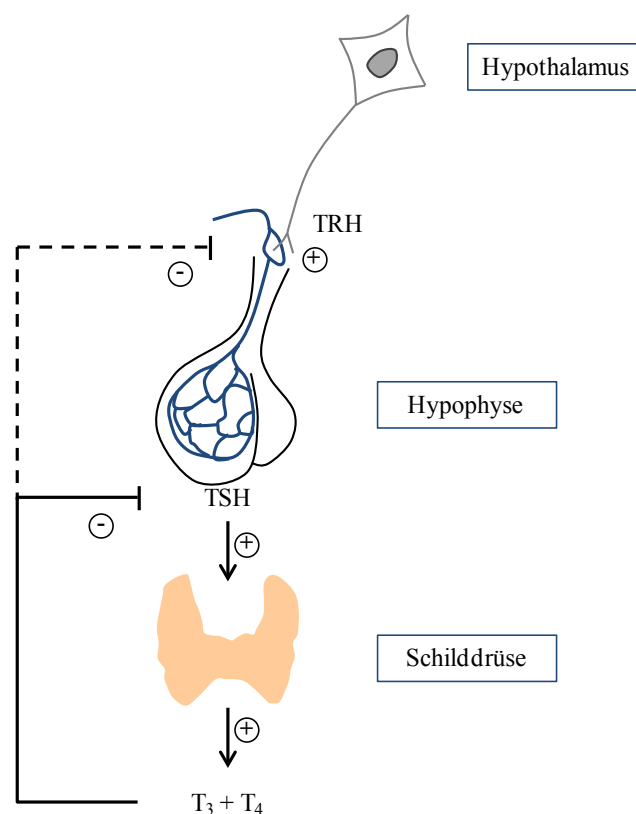


Abb. 3.4: Hypothalamus-Hypophyse Regelkreislauf

Das im Hypothalamus synthetisierte Thyreoliberin (TRH) wird in das Hypophysen-Pfortader-System sezerniert und gelangt so zu seinem Rezeptor auf den basophilen Zellen der Adenohypophyse. Dadurch werden Synthese und Sekretion von Thyreotropin (TSH) stimuliert, das über den Blutweg die Schilddrüse erreicht. Hier werden TSH-vermittelt die Schilddrüsenhormone Triiodthyronin (T_3) sowie Thyroxin (T_4) synthetisiert und sezerniert, die ihrerseits die Synthese und Sekretion von TSH und TRH inhibieren.

Neben diesem Hauptregelkreis wird die Sekretion von TSH auch durch andere Hormone, Zytokine und afferente Signale kontrolliert. Die hierbei beteiligten Effektoren sind noch nicht abschließend charakterisiert. Somatostatin, ein inhibierendes Hormon des Hypothalamus, Neuromedin B und Testosteron hemmen die Freisetzung von TSH, während Prostaglandine und Calcitriol diese fördern (Morley 1981; Törnquist et al. 1990; Pazos-Moura et al. 2003).

Mit den beschriebenen Mechanismen werden beim Gesunden konstante und bedarfsgerechte Blutkonzentrationen der Schilddrüsenhormone reguliert.

3.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Da der TSH-R ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor (GPCR) ist, sollen an dieser Stelle zuerst allgemeine Eigenschaften dieser Rezeptorenfamilie erläutert werden, bevor unter 3.3 die Besonderheiten des TSH-R eingehend beschrieben werden.

Die Superfamilie der humanen GPCR ist mit mehr als 800 Mitgliedern die größte bekannte humane Proteinfamilie und umfasst etwa 2 % des humanen Genoms (Fredriksson et al. 2003; Jacoby et al. 2006; Milligan et al. 2006). GPCR sind membranständige Rezeptoren, deren Funktion darin besteht, extrazelluläre Signale in das Innere der Zelle weiterzuleiten. Sie werden durch die Bindung eines extrazellulären Signalstoffes, eines sog. Liganden, aktiviert und leiten das Signal über die Aktivierung heterotrimerer Guaninnukleotid-bindender Proteine (G-Proteine) in die Zelle. Zu ihren Liganden gehören sowohl Hormone, Neurotransmitter oder auto- und parakrine Faktoren als auch exogene Stimuli wie Licht, Geruchs- und Geschmacksstoffe (Mombaerts 1999; Gudermann et al. 2000).

3.2.1 Struktur

Aufgrund ihrer molekularen Struktur gehören die GPCR zur Gruppe der Transmembranproteine vom Typ III, welche die Membran im Gegensatz zu Typ I und Typ II Transmembranproteinen mehrfach durchqueren. GPCR sind durch sieben transmembranäre Domänen gekennzeichnet, weswegen sie auch als heptahelikale Transmembranproteine bezeichnet werden. Sie bestehen aus einer einzigen Polypeptidkette, wobei sich der Amino-Terminus (N-Terminus) des Rezeptors im Extrazellulärraum befindet, während der Carboxy-Terminus (C-Terminus) im Inneren der Zelle liegt (Rosenbaum et al. 2009). Die Polypeptidkette enthält sieben hydrophobe α -Helices, welche die sieben Transmembrandomänen (TM I-VII) ausbilden. Diese werden durch jeweils drei intrazelluläre (i1-3) sowie extrazelluläre Schleifen (e1-e3) miteinander

verbunden (Rosenbaum et al. 2009). Die Transmembrandomänen der GPCR sind hoch konserviert. Dagegen sind die Aminosäuresequenzen der extra- und intrazellulären Bereiche variabel und besonders i3 sowie N- und C-Terminus weisen teilweise erhebliche Unterschiede auf. Zur Übersicht ist die schematische Darstellung eines GPCR in Abb. 3.5 aufgezeigt.

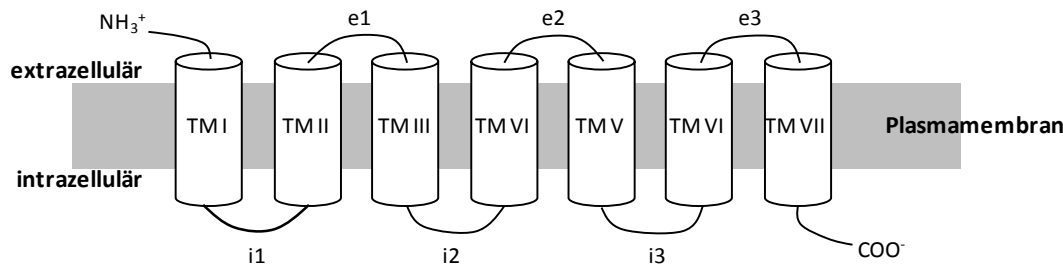


Abb. 3.5: Sekundärstruktur eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (GPCR)

Schematische Darstellung der sieben Transmembrandomänen (TM I-VII) in der Plasmamembran, die durch drei intrazelluläre (i1-3) sowie drei extrazelluläre Schleifen (e1-3) miteinander verbunden sind. Der Amino-Terminus (NH_3^+) befindet sich im Extrazellulärraum, der Carboxy-Terminus (COO^-) im Intrazellulärraum.

3.2.2 Interaktion des GPCR mit G-Proteinen

Die Signalübertragung der GPCR geschieht über heterotrimere Guaninnukleotid (GTP)-bindende Proteine, die vereinfacht als (heterotrimere) G-Proteine bezeichnet werden. Diese bestehen aus einer α -Untereinheit ($G\alpha$) sowie einem $\beta\gamma$ -Komplex ($G\beta\gamma$), der aus einer β - und einer γ -Untereinheit gebildet wird (Hamm 1998; Wettschureck et al. 2005).

Im inaktiven Zustand formen die drei Untereinheiten ein Heterotrimer, das intrazellulär an den GPCR bindet. In dieser Situation ist $G\alpha$ mit einem GDP-Molekül beladen. Wenn der Rezeptor aktiviert wird, findet eine Konformationsänderung des GPCR statt, wodurch eine Dissoziation des GDP-Moleküls ausgelöst wird. Da stattdessen ein GTP-Molekül an die α -Untereinheit gebunden wird, dient der GPCR als Guaninnukleotid-Austauschfaktor (engl.: „guanine nucleotide exchange factor“, GEF) und somit als Aktivator des G-Proteins (Ishii et al. 2003). Dieses dissoziiert nach dem klassischen Modell in seine α -Untereinheit sowie den $\beta\gamma$ -Komplex, die nun unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden aktivieren und zelluläre Effekte hervorrufen. Das G-Protein kehrt in den inaktiven Zustand zurück, wenn $G\alpha$, vermittelt durch GTPase-aktivierende Proteine (engl.: „GTPase activating proteins“, GAP), das GTP zu GDP hydrolysiert. Als GAP können Zielproteine wie z. B. die Phospholipase C β (PLC β) und sog. „regulator of G-protein signalling“ (RGS)-Proteine agieren (Ishii et al. 2003). Die an GDP-gebundene $G\alpha$ -Untereinheit bindet wieder an den $\beta\gamma$ -Komplex (Bos et al. 2007) und kann erneut durch den Rezeptor aktiviert werden. Der beschriebene Mechanismus ist in Abb. 3.6 zusammengefasst.

Damit ein GPCR nach Bindung eines Agonisten wieder in den inaktiven Zustand zurückkehrt, muss sich der Ligand nicht unbedingt vom Rezeptor lösen. Auch eine Phosphorylierung, z. B. durch Zielproteine wie die Proteinkinase A (PKA) oder die Proteinkinase C (PKC), führt durch die Entkopplung des Rezeptors von dem G-Protein zu einer Inaktivierung (Bouvier et al. 1988). Zur Veränderung der Signaltransduktion kann der Rezeptor außerdem endozytiert werden, vermittelt über sog. G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) oder über Arrestine (Ferguson et al. 1996; Bünemann et al. 1999). Darüber hinaus kann er lysosomal degradiert werden oder die Translation des Rezeptors inhibiert werden (Doss et al. 1981; Kallal et al. 1998).

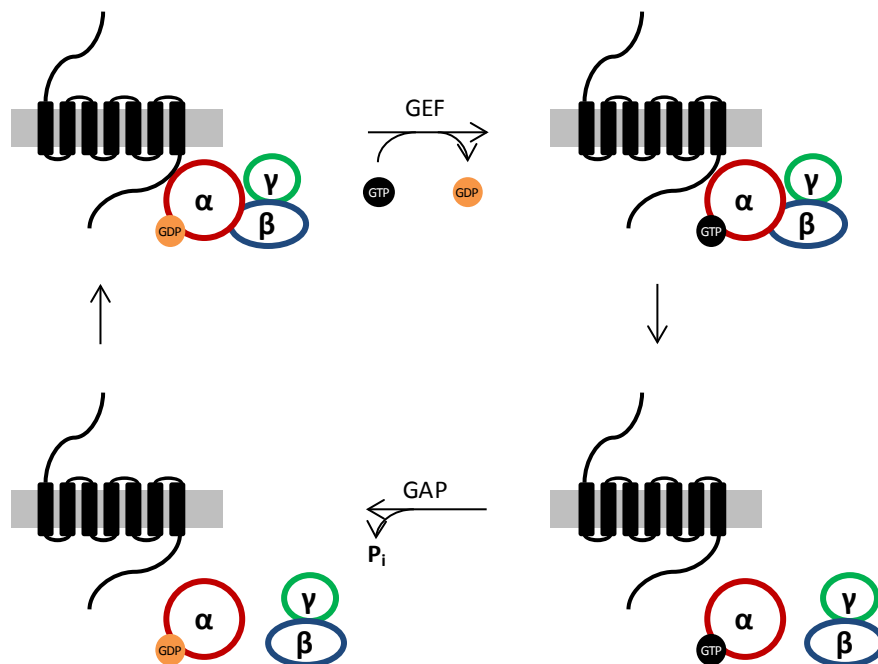


Abb. 3.6: Aktivierungsschema eines heterotrimeren G-Proteins

Im inaktiven Zustand (oben links) ist die α -Untereinheit mit GDP beladen und bindet an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR). Dieser dient bei seiner Aktivierung als GEF (Guaninnukleotid-Austauschfaktor), wodurch ein Austausch von GDP zu GTP katalysiert wird (oben rechts). Dadurch wird das G-Protein aktiviert und dissoziiert in seine α -Untereinheit sowie den $\beta\gamma$ -Komplex (unten rechts), die nun verschiedene Signaltransduktionskaskaden in einer Zelle aktivieren können. Wenn GAP (GTPase-aktivierende Proteine) das GTP-Molekül zu GDP hydrolysieren (unten links), reasoziiert die α -Untereinheit mit dem $\beta\gamma$ -Komplex und das System kehrt in seinen inaktiven Zustand zurück.

Heterotrimere G-Proteine werden üblicherweise nach ihren α -Untereinheiten benannt und eingeteilt. Gegenwärtig sind beim Säuger 21 verschiedene α -Untereinheiten bekannt, die von 16 Genen kodiert werden (Downes et al. 1999; Baltoumas et al. 2013). Sowohl wegen Sequenzhomologien als auch nach funktionellen Aspekten werden sie in vier verschiedene Familien eingeteilt: $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_{12/13}$ (Simon et al. 1991). Jede dieser Proteinfamilien hat spezifische Effektoren, die im Folgenden vorgestellt werden sollen.

3.2.2.1 $G\alpha_s$ -Familie

Nach einer Aktivierung der $G\alpha_s$ -Familie binden diese G-Proteine das transmembranäre Enzym Adenylylcyclase (AC), das aus zwei transmembranären Regionen mit jeweils sechs Transmembrandomänen und zwei zytoplasmatischen Domänen besteht (Hurley 1999). Durch die Bindung von $G\alpha_s$ aktiviert, katalysiert AC die Synthese von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP). Innerhalb von Sekunden wird die intrazelluläre cAMP-Konzentration deutlich erhöht, wodurch vielfältige zelluläre Prozesse eingeleitet werden. Das klassische intrazelluläre Zielmolekül von cAMP ist die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA), die aus zwei regulatorischen sowie zwei katalytischen Untereinheiten besteht (Taylor et al. 1992). Bindet cAMP an die regulatorische Untereinheit, kann die katalytische Untereinheit dissoziieren und daraufhin ATP-abhängig eine Phosphorylierung von spezifischen Serinen und Threoninen an ausgewählten Zielproteinen katalysieren. Neben einer Aktivierung der PKA kann cAMP jedoch auch direkt zelluläre Effekte ausüben, indem es an durch zyklische Nukleotide gesteuerte Ionenkanäle (CNG-Kanäle), eine Kanalfamilie von unselektiven Kationenkanälen, bindet und diese dadurch öffnet (Bradley et al. 2005). Außerdem kann cAMP die GEF-Proteine Epac1 und Epac2 binden und aktivieren, die als GEF für die monomeren G-Proteine Rap1 und Rap2 dienen (Gloerich et al. 2010).

3.2.2.2 $G\alpha_{i/o}$ -Familie

Im Gegensatz zu $G\alpha_s$, das an die zweite zytoplasmatische Domäne der AC bindet und das Enzym dadurch aktiviert, binden $G\alpha_{i/o}$ -Proteine an die erste zytoplasmatische Domäne der AC und inhibieren diese dadurch (Dessauer et al. 1998; Dessauer et al. 2002). Da sie AC inhibieren und so die Bildung von cAMP blockieren, sind $G\alpha_{i/o}$ -Proteine die Gegenspieler von $G\alpha_s$ -Proteinen. Allerdings sind die insgesamt 9 Varianten der AC verschieden sensitiv für eine Inhibition durch $G\alpha_{i/o}$ -Proteine; die Varianten II, VII, VIII und IX werden nahezu nicht beeinflusst, während die AC Typ V und Typ VI am potentesten inhibiert werden (Taussig et al. 1994; Chen-Goodspeed et al. 2005).

3.2.2.3 $G\alpha_{q/11}$ -Familie

Die $G\alpha_{q/11}$ -Familie kann die Isoformen $\beta 1$, $\beta 3$ und $\beta 4$ der Phosphoinositidspezifischen Phospholipase C β (PLC β) stimulieren, die Isoform $\beta 2$ jedoch kaum (Hepler et al. 1993; Jiang et al. 1994). Nach ihrer Aktivierung katalysiert die PLC β die Hydrolyse von membranständigem Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerol (DAG). Das kleine, wasserlösliche

IP₃-Molekül diffundiert durch das Zytosol und kann an der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) an Liganden-gesteuerte IP₃-Rezeptoren binden. Diese erhöhen dadurch ihre Öffnungswahrscheinlichkeit und im ER gespeicherte Calciumionen (Ca²⁺) strömen in das Zytosol, wodurch die intrazelluläre Calciumionenkonzentration ([Ca²⁺]_i) erhöht wird. Die freigesetzten Ca²⁺ können als intrazellulärer Botenstoff, z. B. über die Aktivierung von Calmodulin, verschiedene metabolische Prozesse auslösen (Kretsinger 1980).

Im Gegensatz zu IP₃ bleibt DAG in der Membran verankert und ist an der Aktivierung der Calcium-abhängigen Serin/Threoninkinase Proteinkinase C (PKC) beteiligt, die aufgrund einer erhöhten [Ca²⁺]_i in Richtung Plasmamembran verlagert wird. Die PKC katalysiert daraufhin an ausgewählten Zielproteinen die Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten. Beim Abbau von DAG wird Arachidonsäure freigesetzt, die ebenfalls als Effektormolekül dient oder zu Eicosanoiden metabolisiert wird. Diese sind bekannte Signalstoffe in Schmerz- und Entzündungsprozessen (Funk 2001).

3.2.2.4 Gα_{12/13}-Familie

Die Stimulation von Gα_{12/13}-Proteinen führt unter anderem zu einer Aktivierung von GEFs, wodurch die monomere GTPase RhoA aktiviert wird. Diese stimuliert ihrerseits die Rho-Kinase (ROK), die über die Phosphorylierung ihrer Substrate an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts eine wichtige Rolle spielt, indem Stressfasern ausgebildet und kontrahiert werden. Außerdem werden Zellpolarität, Dynamik von Mikrotubuli, Signalwege des Membrantransports sowie Transkriptionsfaktoren beeinflusst (Etienne-Manneville et al. 2002). Gα_{12/13}-Proteine können auch RhoA-unabhängige Effektormoleküle regulieren, hierbei sind unter anderem Cadherine, Tyrosinkinasen, Protein-Phosphatasen und Hitzeschockproteine betroffen (Kelly et al. 2007).

3.2.2.5 βγ-Komplex

Der βγ-Komplex ist aus einer β- und einer γ-Untereinheit zusammengesetzt, beim Säuger sind 6 verschiedene β- sowie 12 verschiedene γ-Untereinheiten bekannt (Downes et al. 1999; Baltoumas et al. 2013). Durch seine Aktivierung werden verschiedene Signalwege in Zellen reguliert, z. B. können einige βγ-Komplexe die PLCβ aktivieren und so die [Ca²⁺]_i erhöhen (Park et al. 1993) oder durch die Rekrutierung von GRKs zu einer Inaktivierung des GPCR beitragen (Daaka et al. 1997).

3.3 Der humane TSH-R

3.3.1 Expression

Der TSH-R wird auf der Plasmamembran von Follikelepithelzellen exprimiert. Er reguliert sowohl das Wachstum dieser Zellen als auch die Synthese und Sekretion von Schilddrüsenhormonen. Schon bei der Entwicklung der Schilddrüse spielt der Rezeptor eine kritische Rolle. Seine Expression konnte inzwischen auch außerhalb der Schilddrüse nachgewiesen werden, wie z. B. in Adipozyten, Osteozyten oder Monozyten. In diesen Geweben ist die Funktion des TSH-R noch weitgehend ungeklärt.

3.3.2 Struktur

Der TSH-R gehört wie die anderen Glykoprotein-Hormonrezeptoren zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Das Gen des humanen TSH-R ist auf Chromosom 14q31 lokalisiert (Rousseau-Merck et al. 1990) und besteht aus zehn Exons (Gross et al. 1991), die für 764 Aminosäuren kodieren (Nagayama et al. 1989; Misrahi et al. 1990). Dabei enthalten die ersten neun sowie ein Teil des zehnten Exons die Sequenz für die extrazelluläre Domäne; die sieben Transmembrandomänen einschließlich ihrer Verbindungsschleifen sowie der intrazelluläre C-Terminus werden dagegen ausschließlich von dem zehnten und längsten Exon kodiert (Gross et al. 1991).

Nach seiner Expression wird der TSH-R posttranslational modifiziert, unter anderem werden hierbei Asparagin-Reste glykosyliert und es kommt zur Ausbildung von Di- oder Multimeren (Kaczur et al. 2003). Einzigartig für GPCR ist die intramolekulare Spaltung des TSH-R an der Zelloberfläche in eine α - sowie eine β -Untereinheit. Dabei wird die Peptidkette an der extrazellulären Domäne etwa zwischen den Resten 316 und 366 gespalten, wodurch diese Region verloren geht. Die freie α -Untereinheit wird über Disulfidbrücken an die in der Membran verankerte β -Untereinheit gebunden (Loosfelt et al. 1992). Durch eine Reduktion der Disulfidbrückenbindung kann sie jedoch auch vom Rezeptor entfernt werden. Die Funktion des als „shedding“ bezeichneten Prozesses ist bisher nicht eindeutig geklärt.

Charakteristisch für Glykoprotein-Hormonrezeptoren ist eine große extrazelluläre Domäne, die beim humanen TSH-R aus 398 Aminosäuren besteht (Nagayama et al. 1992). Sie enthält den N-Terminus sowie eine Region mit vielen Leucin-Wiederholungen (engl.: „leucine-rich repeats“, LRR) (Kajava et al. 1995), die durch Cystein-reiche Regionen flankiert werden. Jedes dieser LRR-Motive ist aus etwa 20-25 Aminosäureresten zusammengesetzt und besteht aus einem β -Faltblatt sowie einer α -Helix. Beim humanen TSH-R liegen neun solcher Motive vor, die parallel um eine gemeinsame

Achse angeordnet sind. Dabei sind die β -Faltblätter der LRR-Motive nach innen hin zur Achse gerichtet, während die α -Helices nach außen zeigen. Die jeweiligen Liganden der Glykoprotein Hormonrezeptoren werden in der extrazellulären Domäne hochaffin und selektiv gebunden (Seetharamaiah et al. 1994; Da Costa et al. 1998). Aufgrund der Struktur-Analogie zum Ribonuklease-Ribonuklease-Inhibitor Komplex wird vermutet, dass die nicht-Leucin-Aminosäuren der β -Faltblätter maßgeblich, wenn auch nicht ausschließlich, für die Hormonbindung verantwortlich sind (Kobe et al. 1995).

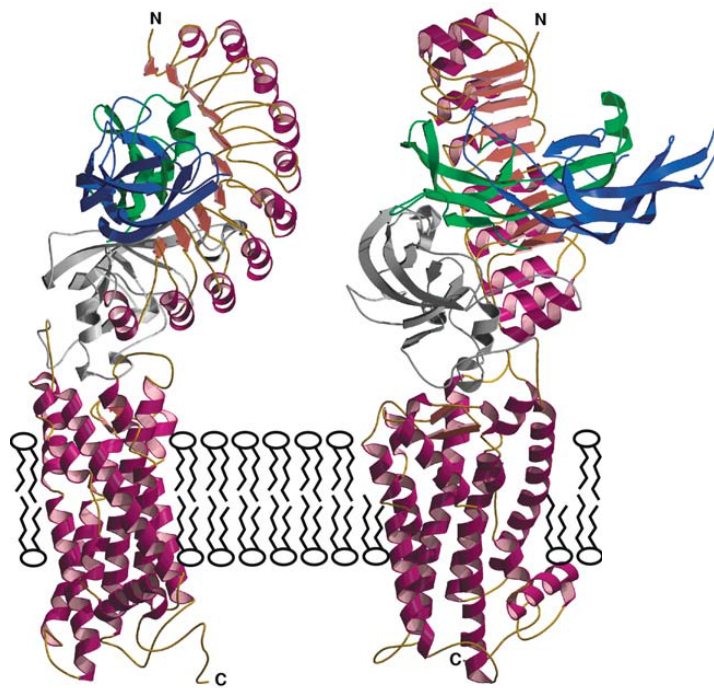


Abb. 3.7: Strukturmodell des humanen Thyreotropin-Rezeptors (TSH-R)

Die Abbildung zeigt dasselbe Modell des humanen TSH-R im Komplex mit TSH, wobei die beiden Ansichten um 90° gedreht sind. Beim TSH-R sind die α -Helices der Transmembrandomänen sowie der Leucin-Wiederholungen in pink, die β -Faltblätter und Schleifen in orange dargestellt. Grau eingefärbt ist der Teil der Peptidkette, der bei der intramolekularen Spaltung verloren geht. Die α -Untereinheit des TSH ist in grün, die β -Untereinheit in blau eingezeichnet (Núñez Miguel et al. 2004).

Die kristalline Struktur des humanen TSH-R ist zum aktuellen Zeitpunkt nicht vollständig bekannt, jedoch konnte diese für einen Teil der extrazellulären Domäne im Jahr 2007 aufgezeigt werden, die einen aktivierenden Antikörper gebunden hat (Sanders et al. 2007). Aufgrund dessen konnte das bis zu diesem Zeitpunkt angenommene Strukturmodell (siehe Abb. 3.7) aktualisiert werden. Dieses ist in Abb. 3.8 aufgezeigt. Kürzlich wurde außerdem die Kristallstruktur von einem Teil der extrazellulären Domäne, die einen inaktivierenden Antikörper gebunden hat, charakterisiert (Sanders et al. 2011).

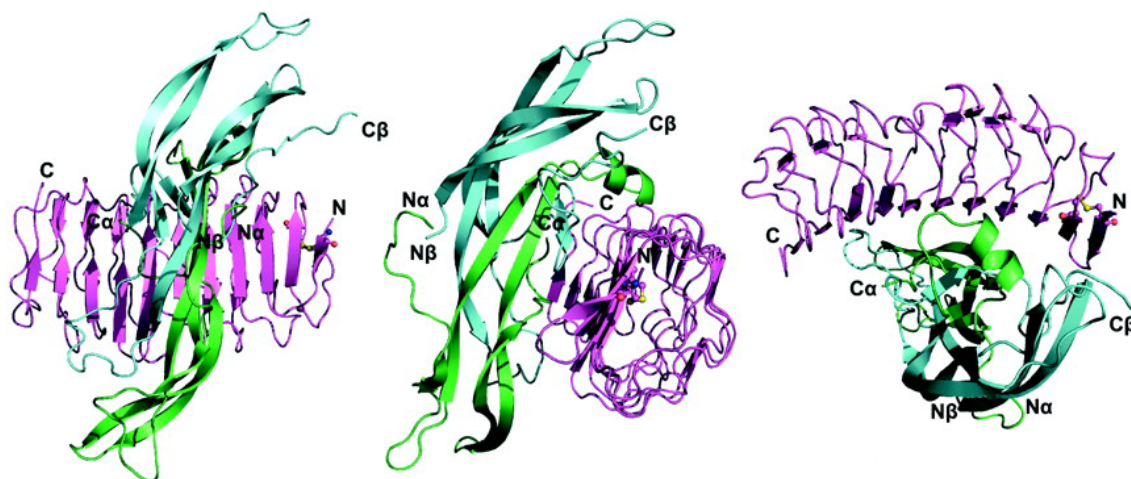


Abb. 3.8: Erneueres Strukturmodell für einen Teil der extrazellulären Domäne des humanen Thyreotropin-Rezeptors (TSH-R)

Die Abbildung zeigt dasselbe Modell der Leucin-Wiederholungen des humanen TSH-R (violett) im Komplex mit TSH (α -Untereinheit in grün, β -Untereinheit in cyan) in drei verschiedenen Ansichten (Núñez Miguel et al. 2008).

Während die extrazelluläre Domäne wichtig für die Ligandenbindung des TSH-R ist, sind die Transmembrandomänen sowie die intrazellulären Schleifen wichtig, um den extrazellulären Stimulus in ein intrazelluläres Signal umzuwandeln (Wonerow et al. 2001). Hierbei sind die intrazellulär gebundenen heterotrimeren G-Proteine von entscheidender Bedeutung. Der humane TSH-R kann mit den G-Proteinen aller vier Familien ($G\alpha_s$, $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{12/13}$) interagieren und so Signale in die Zelle weiterleiten (Laurent et al. 1987; Gudermann et al. 1996; Laugwitz et al. 1996). In Mutagenese-Studien konnte gezeigt werden, dass diese Interaktion, wie auch bei anderen GPCR, vor allem durch die intrazellulären Schleifen i2 und i3 zustande kommt (Gether 2000; Neumann et al. 2005; Claus et al. 2006). Doch auch die intrazelluläre Schleife i1 scheint in die Bindung der G-Proteine involviert zu sein (Kleinau et al. 2010). Für die Aktivierung der G-Proteine ist die intrazelluläre Schleife i3 sowie der N-terminale Teil der Transmembrandomäne TM VI von besonderer Bedeutung, da verschiedene Mutationen oder Deletionen in diesen Regionen die Signaltransduktion des TSH-R beeinflussen (Paschke et al. 1997; Wonerow et al. 1998; Gozu et al. 2005). Diese können unter anderem Liganden-unabhängig zu einer konstitutiven Aktivierung des TSH-R führen (Wonerow et al. 1998). Die molekularen Mechanismen, die eine TSH-R-abhängige G-Protein-Aktivierung bedingen, sind jedoch zum aktuellen Zeitpunkt nicht vollständig verstanden.

3.3.3 TSH-R-induzierte Signalwege

Obwohl der TSH-R an die G-Proteine aller vier Familien binden kann (Laurent et al. 1987; Laugwitz et al. 1996), konnte bisher nur der Aktivierung des G_{α_s} - sowie des $G_{\alpha_{q/11}}$ -Signalweges eine physiologische Funktion zugeordnet werden (Laurent et al. 1987; Dumont et al. 1992). Die Aktivierung des G_{α_s} -Signalweges nach einer Stimulation mit TSH und die folgende Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration sind am besten untersucht. Die meisten zellulären Reaktionen werden vermutlich über diesen Signalweg ausgelöst. So reguliert TSH die Iodid-Aufnahme von Thyreozyten über den G_{α_s} /cAMP-Signalweg, indem die Expression des Natrium-Iodid-Symporters (NIS) gesteigert wird (Weiss et al. 1984a) und der NIS posttranskriptionell verändert wird (Riedel et al. 2001). Auch die Expression von Thyreoglobulin (Van Heuverswyn et al. 1985) sowie die des Enzyms Thyreoperoxidase (Gérard et al. 1988) werden über TSH cAMP-abhängig gesteigert. Synthese und Sekretion der Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 sind ebenfalls abhängig von cAMP-vermittelten Prozessen (Dumont 1971). Außerdem wird die durch TSH vermittelte Proliferation von follikulären Schilddrüsenepithelzellen über den G_{α_s} /cAMP-abhängigen Signalweg reguliert (Roger et al. 1984; Dumont et al. 1989; Kimura et al. 2001). Daneben kann durch die TSH-induzierte cAMP-Produktion der thyreoidale Blutfluss gesteigert werden.

TSH-regulierte Prozesse, die ausschließlich von einer Aktivierung des $G_{i/o}$ -Signalweges abhängig sind, sind in Schilddrüsenzellen gegenwärtig nicht bekannt. Vermutlich wird über den $G_{i/o}$ -Signalweg die Aktivierung des G_{α_s} -Signalweges moduliert, indem die Adenylylcyclase inhibiert wird (Holzapfel et al. 2002; Erdem et al. 2011).

Für die Aktivierung des $G_{\alpha_{q/11}}$ -Signalweges und der nachgeschalteten PLC β -Ca²⁺-Signalkaskade werden in primären humanen Thyreozyten höhere Konzentrationen als für die Aktivierung von G_{α_s} benötigt (Laurent et al. 1987; Yanagita et al. 1996), jedoch sind physiologische TSH-Konzentrationen ausreichend, um die intrazelluläre Calciumionenkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ zu erhöhen (D'Arcangelo et al. 1995). Über die TSH-vermittelte Stimulation von $G_{\alpha_{q/11}}$ wird in der Schilddrüse die Bildung von H₂O₂ angeregt (Kimura et al. 1995; Grasberger 2010) und dadurch ist auch die Iodierung der Tyrosinreste von Thyreoglobulin abhängig von diesem Signalweg (Corvilain et al. 1991; Grasberger 2010). Außerdem wird vermutlich der apikale Efflux von Iod in das Follikellumen über die PLC β -Ca²⁺-Signalkaskade reguliert (Weiss et al. 1984b; Gérard et al. 1994). Distale Effektoren des $G_{\alpha_{q/11}}$ -abhängigen Signalweges sind weitgehend unbekannt.

Selektiv für das G_{13} -Protein konnte eine Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinase 1/2 (ERK 1/2) gezeigt werden (Büch et al. 2008), ansonsten ist zu der Aktivierung von Proteinen der $G\alpha_{12/13}$ Familie bisher wenig bekannt.

Die TSH-R-induzierten Signalwege sind in Abb. 3.9 zusammengefasst.

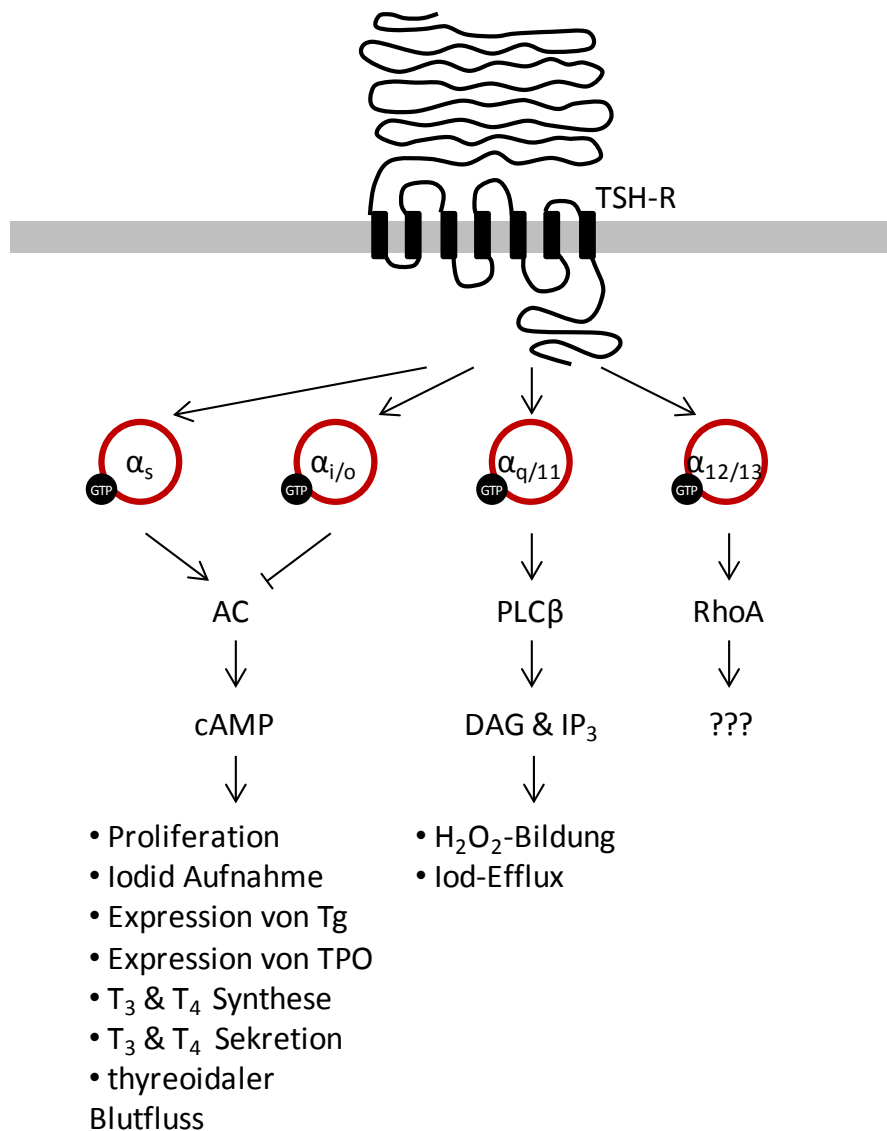


Abb. 3.9: Übersicht zu Thyreotropin-Rezeptor (TSH-R)-induzierten Signalwegen nach Aktivierung verschiedener G-Proteine

TSH-R: Thyreotropin-Rezeptor; AC: Adenylatcyclase; PLC β : Phospholipase C β ; DAG: Diacylglycerol; IP $_3$: Inositol 1,4,5-Trisphosphat; Tg: Thyreoglobulin; TPO: Thyreoperoxidase; T_3 : Triiodthyronin; T_4 : Thyroxin.

3.3.4 Pathophysiologie des TSH-R

Die Bedeutung des TSH-R wird hervorgehoben durch verschiedene Krankheiten, die durch Funktionsstörungen des TSH-R hervorgerufen werden oder mit ihnen einhergehen. Diese sollen im Folgenden näher erläutert werden.

3.3.4.1 Morbus Basedow, Immunhyperthyreose

Morbus Basedow ist eine Autoimmunerkrankung, bei der körpereigene Antikörper den TSH-R aktivieren. Ihre Benennung erfolgt im deutschsprachigen Raum nach ihrem deutschen Erstbeschreiber Carl Adolph von Basedow, ist jedoch auch als Immunhyperthyreose oder (nach ihrem Erstbeschreiber Robert James Graves) als Graves' Disease bekannt. Vom Morbus Basedow sind etwa 0.5-2 % der kaukasischen Bevölkerung betroffen, er ist der häufigste Grund einer Hyperthyreose (Płoski et al. 2011). Die Dauerstimulation des TSH-R führt zur chronischen Proliferation der Thyreozyten, außerdem kommt es zur vermehrten Synthese und Sekretion der Schilddrüsenhormone T₃ und T₄. Die häufigsten Symptome beim Morbus Basedow, Struma, Tachykardie und Exophthalmus, werden als Merseburger Trias zusammengefasst. Weitere Symptome können Gewichtsabnahme, Durchfall, Zittern, vermehrtes Schwitzen sowie verminderte Leistungsfähigkeit sein.

3.3.4.2 Autoimmunhypothyreose

Bei der Autoimmunhypothyreose kommt es auf Grund einer Autoimmunerkrankung zur Schilddrüsenunterfunktion. Typische Symptome sind Müdigkeit, Appetitlosigkeit, Gewichtszunahme, Kälteintoleranz und Obstipation.

Bei der Hashimoto-Thyreoiditis (Hashimoto 1912), der häufigsten Ursache einer primären Schilddrüsenunterfunktion, die nach ihrem japanischen Erstbeschreiber Haku Hashimoto benannt wurde, wird die Schilddrüse in zellulären und humoralen Immunprozessen zerstört. Ursache hierfür sind vermutlich körpereigene Antikörper gegen Thyreoglobulin (Tg) sowie gegen das Enzym Thyreoperoxidase (TPO). Bei der Hashimoto-Thyreoiditis kann es zur Hypertrophie der Schilddrüse, verursacht durch eingewanderte Lymphozyten, kommen. Häufiger ist jedoch eine Form, bei der die Schilddrüse verkleinert ist.

Bei etwa 15 % der Patienten mit einer Autoimmunhypothyreose wird vermutet, dass diese durch blockierende Autoantikörper gegen den TSH-R verursacht wird (Arikawa et al. 1985; Rieu et al. 1996).

3.3.4.3 Benigne Schilddrüsenknoten

In Deutschland stellen knotige Veränderungen der Schilddrüse die häufigste endokrine Erkrankung dar. Etwa 30 % der erwachsenen Bevölkerung sind davon betroffen (Karger et al. 2006), Frauen häufiger als Männer. Mehr als 95 % sind benigne Schilddrüsenknoten, die besonders häufig in Iodmangel-Regionen auftreten, zu denen auch Teile Deutschlands gehören (Meng et al. 2002). Benigne Schilddrüsenknoten werden morphologisch in Kolloidknoten und follikuläre Adenome eingeteilt. Funktionell erfolgt die Klassifizierung aller Schilddrüsenknoten nach szintigrafischen Befunden in „heiße“, „indifferente“ sowie „kalte“ Knoten; je nach einer erhöhten, normalen oder verminderten Iodaufnahme. Dabei sind etwa 50-85 % „kalt“, bis zu 40 % szintigrafisch indifferent und etwa 10 % „heiß“ (Paschke 2011). Heiße Knoten sind auf molekularer Ebene oft gekennzeichnet durch einen konstitutiv-aktiven TSH-R oder eine somatische Mutation im G_{α_s} -Protein. In verschiedenen Studien zeigten sich bei 8-82 % aller untersuchten heißen Knoten eine aktivierende Mutation im *TSH-R*-Gen und in 8-75 % eine G_{α_s} -Mutation (Eszlinger et al. 2007). Die molekulare Ursache von heißen Knoten ohne eine dieser Mutationen ist noch nicht bekannt (Eszlinger et al. 2007).

In benignen kalten Knoten ist die verminderte Iodaufnahme bedingt durch eine verminderte Expression des Natrium-Iodid-Symporters (NIS) oder dessen defekten Zellmembrantransport (Tonacchera et al. 2002). In diesem Zusammenhang konnten jedoch bisher keine Gendefekte nachgewiesen werden (Neumann et al. 2004; Krohn et al. 2005; Krause et al. 2007). Die molekularen Hintergründe zur Entstehung von benignen kalten Knoten sind weitgehend ungeklärt, obwohl diese oftmals monoklonalen Ursprungs sind und daher eine somatische Mutation in einer einzigen Zelle zu deren Entstehung führen könnte (Hicks et al. 1990; Apel et al. 1995; Paschke 2011).

3.4 Schilddrüsenkarzinome

3.4.1 Epidemiologie und medizinische Bedeutung

Während es sich bei heißen Knoten bis auf wenige Ausnahmen ausschließlich um benigne Veränderungen handelt, sind 5-10 % aller kalten Knoten maligne (Belfiore et al. 1992; Hegedüs et al. 2003). Schilddrüsenkrebs ist die häufigste endokrine Neoplasie und macht etwa 1-3 % aller Tumoren aus. Frauen sind etwa dreimal häufiger betroffen als Männer. In den USA wurde bei ihnen Schilddrüsenkrebs als siebthäufigste Krebsart im Jahr 2012 diagnostiziert (Siegel et al. 2012). Etwa 95 % aller Schilddrüsentumore entstehen durch die Transformation der Follikelepithelzellen oder deren Vorläuferzellen. Diese teilt die Weltgesundheitsorganisation (engl.: „World Health

Organization“, WHO) aufgrund funktioneller und morphologischer Kriterien in vier verschiedene Subtypen ein: differenzierte Schilddrüsenkarzinome vom papillären oder vom follikulären Typ, gering differenziertes Schilddrüsenkarzinom und undifferenziertes/anaplastisches Schilddrüsenkarzinom (DeLellis et al. 2004). Außerdem können Schilddrüsentumoren aus den parafollikulären C-Zellen entstehen, diese bilden das medulläre Schilddrüsenkarzinom. Im Folgenden sollen die verschiedenen Schilddrüsenkarzinom-Subtypen näher charakterisiert werden.

3.4.1.1 Papilläre Schilddrüsenkarzinome

Papilläre Schilddrüsenkarzinome sind mit etwa 70-80 % die häufigsten aller Schilddrüsentumore (Hundahl et al. 1998; Busnardo et al. 2000). Ihre Benennung geht auf die Tatsache zurück, dass die Tumorzellen papilläre Strukturen ausbilden. Morphologisch entscheidend ist jedoch die charakteristische Veränderung der Zellkerne, diese sind optisch leer („Milchglaskerne“), haben zytoplasmatische Einschlüsse sowie längs verlaufende Einkerbungen und sind dachziegelartig übereinander gestapelt. Papilläre Schilddrüsenkarzinome treten meistens bei Frauen zwischen 30 und 50 Jahren auf und metastasieren vorwiegend lymphogen. Obwohl sie zu den differenzierten Schilddrüsentumoren zählen, synthetisieren sie keine Schilddrüsenhormone.

3.4.1.2 Follikuläre Schilddrüsenkarzinome

Mit etwa 10-15 % aller Schilddrüsentumoren ist das follikuläre Schilddrüsenkarzinom der zweithäufigste Subtyp (Busnardo et al. 2000). Dieser kommt am häufigsten bei Frauen zwischen 40 und 60 Jahren vor und tritt in Iodmangelgebieten vermehrt auf. Follikuläre Schilddrüsenkarzinome zeigen ähnliche Charakteristika wie benignes Schilddrüsengewebe, sind in Follikeln angeordnet und ähneln morphologisch dem Schilddrüsenadenom. Ihre Metastasierung erfolgt überwiegend auf dem Blutweg, wobei unter anderem Lunge, Knochen, Gehirn und Leber Ziele sein können.

3.4.1.3 Medulläre Schilddrüsenkarzinome

Medulläre Schilddrüsenkarzinome betreffen etwa 5 % aller Schilddrüsenkarzinome und treten hauptsächlich zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr auf (Kloos et al. 2009). Im Gegensatz zu den übrigen Schilddrüsentumoren entwickeln sich medulläre Schilddrüsenkarzinome nicht aus Thyreozyten, sondern entstehen durch die Transformation der parafollikulären C-Zellen. Daher werden bei einem medullären Schilddrüsenkarzinom häufig unnatürlich hohe Mengen des Hormons Calcitonin im Blutspiegel diagnostiziert.

3.4.1.4 Anaplastische und gering differenzierte Schilddrüsenkarzinome

Etwa 1-2 % der Schilddrüsenkarzinome sind vom anaplastischen Typ (Nagaiah et al. 2011). Ihre Entstehung ist nicht endgültig geklärt. Nach dem klassischen mehrstufigen Karzinogenese-Modell entstehen anaplastische Schilddrüsenkarzinome aus bereits existierenden differenzierten oder gering differenzierten Schilddrüsenkarzinomen. Nach dem Krebs-Stammzell-Modell hat dagegen jeder Schilddrüsenkarzinom-Subtyp einen eigenen Ursprung (Lin 2011). Anaplastische Schilddrüsenkarzinome sind bei jüngeren Patienten sehr selten, die Betroffenen sind bei der Diagnose überwiegend älter als 65 Jahre. Das Gewebe dieser Krebsart ist undifferenziert, die Struktur des normalen Schilddrüsengewebes so gut wie nicht mehr erkennbar. Der Tumor wächst sehr schnell in umliegendes Gewebe ein, bildet frühzeitig Metastasen und gilt daher als sehr bösartig.

Das gering differenzierte Schilddrüsenkarzinom weist funktionelle und morphologische Charakteristika sowohl aus differenzierten papillären bzw. follikulären als auch aus anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen auf und stellt möglicherweise eine Zwischenstufe bei der Progression von differenzierten Schilddrüsenkarzinomen zu anaplastischen Schilddrüsenkarzinom dar (Patel et al. 2006).

3.4.2 Molekulare Grundlagen

Die meisten Schilddrüsentumoren sind monoklonale Neoplasien und vermutlich auf somatische genetische Veränderungen wie z. B. Punktmutationen oder Genumlagerungen einer einzigen Zelle zurückzuführen (Krohn et al. 2007; Schmid 2010). Da die Proliferationsraten gesunder Schilddrüsenepithelzellen jedoch gering sind und die Tumorzinzidenz im Vergleich dazu sehr hoch ist, könnte die Entstehung von Schilddrüsentumoren durch eine erhöhte Mutationsrate hervorgerufen werden. Hierbei spielt das für die Hormonsynthese benötigte H_2O_2 eine wichtige Rolle (Schmid 2010). Auch wenn es selbst der DNA wenig anhaben kann, ist es an der Bildung sog. reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wie z. B. dem hochreaktiven Hydroxy-Radikal $\cdot OH$ beteiligt, das DNA oxidieren kann und sie dadurch schädigt. Schilddrüsenepithelzellen verfügen zwar über ein potentes Abwehrsystem gegen ROS, jedoch kann dieses bei oxidativem Stress, der z. B. durch Iodmangel oder Rauchen verursacht wird, beeinträchtigt werden (Krohn et al. 2007). Außerdem können andere Umweltfaktoren wie z. B. radioaktive Strahlung oder genetische Faktoren (weibliches Geschlecht, familiäre Prädisposition) die Entstehung eines Schilddrüsenkarzinoms fördern (Schmid 2010).

Der molekulare Mechanismus, über den Schilddrüsenkarzinome zur Proliferation angeregt werden, ist in den verschiedenen Schilddrüsenkarzinom-Subtypen unterschiedlich und durch charakteristische genetische Veränderungen gekennzeichnet. Beim

papillären Schilddrüsenkarzinom liegt in etwa 70 % der Fälle eine konstitutive Aktivierung des Signaltransduktionsweges der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) zugrunde (Kimura et al. 2003; Adeniran et al. 2006), die in gesunden Zellen durch Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine aktiviert werden kann und Zellwachstum, Differenzierung sowie das Überleben von Zellen initiiert. Hierbei treten häufig Punktmutationen in den *BRAF*- oder *RAS*-Genen auf, bei Strahlen-induzierten Tumoren vor allem bei jüngeren Patienten kommt es durch Doppelstrangbrüche jedoch auch häufig zur Bildung von Fusionsgenen (RET Tyrosinkinase Rezeptor, TRK- und AKAP9/Braf-Rearrangements), wodurch ebenfalls die MAPK-Signalkaskade aktiviert wird (Nikiforov et al. 2011). Der entscheidende andauernde Wachstumsstimulus beim follikulären Schilddrüsenkarzinom ist dagegen noch nicht eindeutig identifiziert. Derzeit sind zwei verschiedene molekulare Veränderungen bei follikulären Schilddrüsentumoren bekannt. Zum einen finden sich in 30-50 % der Karzinome ebenfalls Mutationen in den *RAS*-Genen (N-, K-, H-RAS), womit eine konstitutive Aktivierung des MAPK-Signaltransduktionskaskade sowie des PI3K/Akt-Signalwegs verbunden sein kann (Basolo et al. 2000). Zum anderen wird bei etwa 30-40 % die Fusion von Anteilen des Transkriptionsfaktors Pax8 mit dem nukleären Rezeptor PPAR γ beobachtet, wodurch es zur Überexpression von PPAR γ kommt (Kroll et al. 2000). Tumore mit einem Pax8/PPAR γ -Fusionsgen sind oftmals von jüngerem Alter und geringerer Größe, außerdem invadieren sie häufiger vaskuläres Gewebe als Tumore ohne das Fusionsgen (French et al. 2003; Nikiforova et al. 2003). Die genaue molekulare Funktion des Pax8/PPAR γ -Fusionsgens im Schilddrüsenkarzinom ist jedoch bis heute nicht hinreichend geklärt. Als entscheidender molekularer Mechanismus für das anaplastische Schilddrüsenkarzinom gilt der Funktionsverlust des Tumorsuppressors p53. Dieser ist verantwortlich für den aggressiven Phänotyp des anaplastischen Schilddrüsenkarzinoms und wird durch Punktmutationen des *p53*-Gens verursacht. Die Identifizierung von Mutationen sowie aktivierten Signalwegen im Schilddrüsenkarzinom bilden die Grundlage für die Entwicklung neuer zielgerichteter Therapien. Aktuell befinden sich mehrere Medikamente in klinischen Studien, die gegen die Aktivierung spezifischer Signalwege gerichtet sind. Um in Zukunft noch bessere Therapien zu entwickeln, ist die weitere Aufklärung molekularer Mechanismen in den verschiedenen Schilddrüsenkarzinomen daher durchaus sinnvoll.

3.4.3 Rolle des TSH-R in Schilddrüsenkarzinomen

Der klassische physiologische Stimulus für die Proliferation von Follikelepithelzellen ist die Bindung von TSH an seinen Rezeptor. Nach Aktivierung des TSH-R wird das Wachstum der Thyreozyten sowohl direkt als auch indirekt, über die Sekretion von

autokrinen Wachstumsfaktoren sowie die Expression von Wachstumsfaktoren-Rezeptoren und von VEGF, stimuliert.

Aus diesem Grund werden differenzierte Schilddrüsenkarzinome klassischerweise nach einer Thyreoidektomie¹ und einer Radioiodidtherapie² mit einer TSH-suppressiven Schilddrüsenhormon-Therapie behandelt (Cooper et al. 2009; Sherman 2011). Dadurch soll sichergestellt werden, dass potentiell überlebende Schilddrüsenkarzinomzellen von TSH nicht zum Wachstum angeregt werden. Für die Therapie wird Levothyroxin eingesetzt, welches im Körper zu T₃ umgesetzt wird. Es soll sowohl die Sekretion von TSH im thyreotropen Regelkreis inhibieren als auch die fehlenden Schilddrüsenhormone ersetzen (Byrd et al. 2012).

Die Rolle des TSH-Rezeptorproteins bei der Karzinogenese sowie der Proliferation von Schilddrüsenkarzinomzellen ist zum aktuellen Zeitpunkt jedoch nicht ausreichend geklärt. In zwei verschiedenen Mausmodellen, die aufgrund einer spezifischen Mutation spontan follikuläres bzw. papilläres Schilddrüsenkarzinom entwickeln, kam es nach einer Kreuzung mit einer TSH-R "knock-out"-Maus (*Tsh-r^{-/-}*) zu keiner Ausbildung von Schilddrüsenkarzinomen mehr (Lu et al. 2010; Franco et al. 2011). Diese Studien deuten darauf hin, dass der TSH-R bei der Karzinogenese der Schilddrüse notwendig ist. Mit zunehmender Dedifferenzierung der Schilddrüsenkarzinome nimmt die Expression des TSH-R jedoch immer weiter ab und die fehlende TSH-R Expression wird mit einem maligneren Phänotyp in Verbindung gebracht (Shi et al. 1993; Tanaka et al. 1997; Matsumoto et al. 2008). Die Transfektion des TSH-R kann in solchen Zellen zur Redifferenzierung beitragen (Feng et al. 2012) und den malignen Phänotyp abmildern, da die Anwesenheit eines TSH-R *in vitro* in einem weniger adhäsiven und invasiven Potential der Zellen resultierte und die Xenotransplantation solcher Zellen mit einer längeren Latenzzeit verbunden war (Hoffmann et al. 2006). Aufgrund dieser Beobachtungen ist die Aktivierung des TSH-R vermutlich nicht der entscheidende Faktor für die Proliferation von Schilddrüsenkarzinomen. Dafür spricht auch, dass ein konstitutiv-aktiver TSH-R oder eine somatische Mutation im Gα_s-Protein follikuläre Adenome verursachen, in malignen Schilddrüsenengeweben jedoch nur selten gefunden werden (Lyons et al. 1990; Matsuo et al. 1993; Parma et al. 1993; Paschke et

¹ Chirurgische Entfernung der gesamten Schilddrüse

² Eine Radioiodidtherapie kann nur angewendet werden, wenn die Schilddrüsenkarzinomzellen Iod aufnehmen. In diesem Fall wird dem Patienten das radioaktive Iod Isotop ¹³¹I (β- und γ-Strahler, mittlere Reichweite: 0,5 mm; Halbwertszeit: 8,02 Tage) peroral verabreicht, das nach seiner Resorption nahezu ausschließlich von Schilddrüsenepithelzellen aufgenommen wird, was durch TSH verstärkt werden kann. Nicht aufgenommenes ¹³¹I wird innerhalb kurzer Zeit über die Nieren ausgeschieden. Die radioaktive Strahlung induziert in der Umgebung DNA-Schäden (überwiegend Doppelstrangbrüche), wodurch die Apoptose der Zellen eingeleitet wird. Auf diese Weise können nach einem chirurgischen Eingriff zurückgebliebene Reste der Schilddrüse und im Idealfall auch Metastasen eliminiert werden.

al. 1997). Darüber hinaus kann der Adenylylcyclase-Aktivator Forskolin die Proliferation von Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien sogar inhibieren (Yano et al. 2007). Zumindest der durch TSH aktivierte G_{α_s} /cAMP-abhängige Signalweg ist daher nur in nicht-malignes Wachstum von Schilddrüsenepithelzellen involviert. Bisher konnten in Schilddrüsenkarzinomzellen keine somatischen Mutationen in Genen der G_{α_q} - oder $G_{\alpha_{11}}$ -Proteine gezeigt werden, die eine konstitutive Aktivierung der PLC-PKC Signalkaskade bedingen (Ringel et al. 1998). Jedoch führt die Stimulation der PKC *in vitro* zu einer Proliferation und Dedifferenzierung von Thyreozyten (Gallo et al. 1992; Portella et al. 1998) und in Schilddrüsenkarzinomen konnten erhöhte Aktivitäten sowohl der PLC als auch der PKC beobachtet werden (Kobayashi et al. 1993). Darüber hinaus kann TSH die Adhäsion, Migration und Invasion von Schilddrüsenkarzinomzellen über die PLC-PKC Signalkaskade stimulieren (Hoelting et al. 1993; Hoelting et al. 1994; Zielke et al. 1999). Dies deutet auf eine Rolle des $G_{\alpha_{q/11}}$ -Signalweges und eine dadurch bedingte Aktivierung der PLC und PKC in Schilddrüsenkarzinomzellen hin. Hinzu kommt, dass es bei einem konditionalen Knockout von G_{α_q} in murinen Thyreozyten nur zu verkleinerten Schilddrüsen und einem starken Mangel an Schilddrüsenhormonen T_3 und T_4 (schwere Hypothyreose) kam (Kero et al. 2007).

3.5 Der Transkriptionsfaktor NFAT

Die Familie der NFAT Transkriptionsfaktoren (engl.: „nuclear factor of activated T cells“) besteht aus fünf verschiedenen Proteinen: NFATc1 (Synonyme: NFAT2, NFATp), NFATc2 (Synonyme: NFAT1, NFATc), NFATc3 (Synonyme: NFAT4, NFATx), NFATc4 (Synonym: NFAT3) sowie NFAT5 (Synonym: TonEBP, OREBP). Ihre Benennung geht auf ihre Erstbeschreibung in T-Zellen zurück, in denen sie die Transkription von Interleukin 2 (IL-2) initiieren und so zu einer Aktivierung der T-Zellen beitragen (Shaw et al. 1988). Die Proteine spielen darüber hinaus jedoch im gesamten Immunsystem eine Schlüsselrolle, da sie die Transkription vieler Zytokine sowie anderer Gene, die für die Immunreaktion wichtig sind, regulieren. Ihre tragende Rolle im Immunsystem wird hervorgehoben durch die Tatsache, dass die Inhibition ihrer Aktivierung z. B. mittels der Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A (CsA) und Tacrolimus (FK 506) immunsuppressiv ist. Daher werden Calcineurin-Inhibitoren, vor allem FK 506, nach Organtransplantationen vielfach eingesetzt (Meier-Kriesche et al. 2006). NFAT Proteine sind jedoch nicht spezifisch für das Immunsystem, sondern werden nahezu ubiquitär exprimiert.

3.5.1 Struktur

Die Calcium-regulierten NFAT Transkriptionsfaktoren NFATc1, NFATc2, NFATc3 und NFATc4 sind untereinander näher verwandt, wogegen das Calcium-unabhängig regulierte NFAT5 weniger Sequenzhomologien aufweist. Da NFAT5 in dieser Arbeit keine übergeordnete Rolle spielt, soll im Folgenden ausschließlich auf die Besonderheiten der Calcium-regulierten NFAT-Varianten (siehe Abb. 3.10) eingegangen werden. Diese haben zwei verschiedene konservierte Regionen: die hoch konservierte DNA-bindende Region (DBR) sowie die etwas weniger konservierte aber charakteristische NFAT Homologie Region (NHR). Die DBR der NFAT Proteine ist strukturell sehr ähnlich zur DBR der Familie der Rel Transkriptionsfaktoren (auch als NFκB Familie bekannt) und wird deswegen häufig auch als Rel Homologie Region (RHR) bezeichnet (Jain et al. 1995). Neben der Bindung von DNA ist die DBR außerdem in Protein-Protein-Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren involviert (Hogan et al. 2003; Macian 2005). In der NHR ist eine Transaktivierungsdomäne (TAD) enthalten, welche an Promotorelemente binden kann und so die Transkription von Zielgenen initiiert. Zusätzlich ist die TAD in der Lage, mit transkriptionellen Bindungspartnern zu interagieren. Daneben befinden sich in der NHR Serin-reiche (SRR) sowie Serin- und Prolin-reiche Regionen (SP), deren Serin-Reste im inaktiven Zustand von NFAT phosphoryliert sind. Außerdem ist eine Calcineurin Bindungsstelle (CB) enthalten, wobei Calcineurin im gebundenen Zustand Serin-Reste dephosphorylieren und damit den Transkriptionsfaktor aktivieren kann (Aramburu et al. 1998).

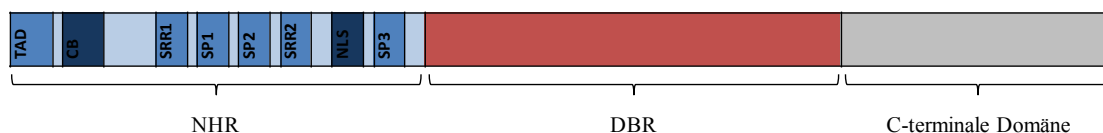


Abb. 3.10: Primäre Struktur der Calcium-regulierten NFAT Proteine

Die Primäre Struktur der Calcium-regulierten NFAT Proteine NFATc1, NFATc2, NFATc3 und NFATc4 enthält eine NFAT Homologie Region (NHR), eine DNA-bindende Region (DBR) sowie eine C-terminale Domäne. In der NHR befinden sich eine N-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD), die Calcineurin Bindungsstelle (CB), Serin-reiche Regionen (SRR1 und SRR2) sowie Serin- und Prolin-reiche Motive (SP1, SP2 und SP3). Die DNA-bindende Region (DBR) kann neben DNA auch mit transkriptionellen Bindungspartnern interagieren. Die Länge der C-terminalen Domäne ist bei den verschiedenen NFAT Proteinen sowie deren alternativen Splicevarianten unterschiedlich. Abbildung modifiziert nach Mancini et al. (Mancini et al. 2009).

3.5.2 Aktivierungsmechanismus

Die Calcium-abhängige Aktivierung der NFAT-Transkriptionsfaktoren wurde im Wesentlichen in Immunzellen erforscht, kann aber auch auf andere Zellsysteme übertragen werden (Mancini et al. 2009). Initiiert wird die Aktivierung von NFATc1, NFATc2, NFATc3 und NFATc4 durch eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-ionenkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ und die folgende Aktivierung der Calcium-Calmodulin-abhängigen Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin. Diese ist aus einer katalytischen Untereinheit A (CnA) sowie einer regulatorischen Untereinheit B (CnB) zusammengesetzt (Klee et al. 1978; Klee et al. 1988). Neben einer katalytischen Domäne enthält CnA eine CnB-bindende Domäne sowie eine regulatorische Domäne, die zwei Unterdomänen enthält: eine Bindungsstelle für das Calcium-bindende Protein Calmodulin sowie eine autoinhibitorische Domäne (Hubbard et al. 1989; Rusnak et al. 2000). CnB ist homolog zu Calmodulin und kann vier Calciumionen binden (Stemmer et al. 1994). Im Ruhezustand ist die $[Ca^{2+}]_i$ sehr niedrig und Calcineurin inaktiv, da seine enzymatisch aktive Seite von der autoinhibitorischen Domäne maskiert wird. Bei einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ binden Calciumionen sowohl an CnB, wodurch es zur Konformationsänderung in der regulatorischen Domäne der CnA und so zur Aufdeckung der Calmodulin-bindenden Unterdomäne kommt (Yang et al. 2000b), als auch an Calmodulin. Dieses kann daraufhin mit seiner Bindungsstelle in der regulatorischen Domäne interagieren, wodurch es zu einer Konformationsänderung kommt und die autoinhibitorische Domäne von der enzymatisch aktiven Seite verlagert wird (Rumi-Masante et al. 2012). Die beschriebene Calcineurin-Aktivierung ist der Schlüsselprozess für die Aktivierung von NFAT Proteinen. Im inaktiven Zustand sind diese im Zytoplasma der Zelle lokalisiert und an mehreren Serin-Resten phosphoryliert (Hogan et al. 2003). Bei der Interaktion mit dem aktiven Calcineurin kommt es durch die Dephosphorylierung von ausgewählten Serin-Resten zur Aktivierung der NFAT Proteine. Zum einen wird durch die Dephosphorylierung die nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) freigelegt und über die Bindung von Importinen ein nukleärer Import ermöglicht, zum anderen wird durch die Dephosphorylierung die Affinität des Transkriptionsfaktors für seine Bindungsmotive an DNA erhöht (Okamura et al. 2000). Nach ihrer Aktivierung werden NFAT Proteine also in den Zellkern transportiert, wo sie an die Promoterregionen ihrer Zielgene binden und so deren Transkription initiieren (Macian 2005). Inaktiviert wird NFAT bei einer Phosphorylierung durch nukleäre Serin/Threonin Kinasen, sog. Exportkinasen (K_{ex}), wie z. B. die Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3), die Casein Kinase (CK1) oder die Dual-spezifischen Tyrosin Phosphorylierungs-regulierten Kinasen 1 und 2 (DYRK1 und DYRK2) (Mancini et al. 2009). Hierbei wird die NLS maskiert, stattdessen eine nukleäre Export-Sequenz (NES)

freigelegt und so über die Bindung des Exportins Crm1 ein nukleärer Export initiiert (Kehlenbach et al. 1998). Im Zytoplasma befinden sich außerdem sog. Erhaltungskinasen (K_{eh}), die NFAT zusätzlich phosphorylieren und so einen Transport in den Zellkern verhindern (Mancini et al. 2009).

Die für die NFAT-Aktivierung nötige Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ wird durch eine Stimulation von Oberflächenrezeptoren, die die Phospholipase C (PLC) aktivieren, erreicht. Dabei aktivieren Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) sowie Immunorezeptoren die $PLC\gamma$, während G-Protein-gekoppelte Rezeptoren die $PLC\beta$ aktivieren (Gwack et al. 2007). Die daraus resultierende Freisetzung von Calciumionen aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) führt allerdings nur zu einer transienten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$. Sie ist oftmals zu schwach für eine effiziente NFAT-Aktivierung und vermag NFAT-abhängige Zielgene nicht (ausreichend) zu induzieren (Crabtree et al. 2002). Hierzu ist eine anhaltende Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nötig. Diese wird durch die anschließende Öffnung bestimmter Speicher-operierter Kanäle (SOC), sog. CRAC-Kanäle (engl.: „calcium release-activated channel“), erzielt. Kürzlich konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass die $[Ca^{2+}]_i$ in der Nähe des CRAC-Kanals wichtiger für die NFAT-Aktivierung ist als eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ im gesamten Zytoplasma der Zelle (Kar et al. 2011). In Immunzellen sind die Kandidaten, die an der Öffnung von CRAC-Kanälen beteiligt sind und so eine anhaltende Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ bedingen, weitgehend identifiziert. Hier wird die abfallende Calciumionenkonzentration im ER über das transmembranäre Calcium Sensorprotein STIM1 (engl.: „sensor stromal interaction molecule 1“), das diffus in der ER Membran verteilt ist, registriert. Ist STIM1 aufgrund der ER Depletion nicht mehr an Calciumionen gebunden, kommt es zur Oligomerisierung und zur anschließenden Translokation sowie Aggregation in der ER Membran an Stellen, die mit der Plasmamembran verbunden sind (Zhang et al. 2005; Srikanth et al. 2013). Durch die direkte Interaktion von STIM1 mit CRAC-Kanälen werden diese geöffnet und es kommt zum Calciumioneneinstrom in das Zytosol (Park et al. 2009). Als Poren-bildende Untereinheit der CRAC-Kanäle konnte hierbei ORAI1 identifiziert werden (Prakriya et al. 2006; Yeromin et al. 2006). Die besondere Bedeutung von STIM1 und ORAI1 im Immunsystem wird dadurch hervorgehoben, dass ein Funktionsverlust von STIM1 und/oder ORAI1 eine Immundefizienz hervorruft (Srikanth et al. 2013).

Der Mechanismus zur NFAT-Regulation ist in Abb. 3.11 zusammengefasst.

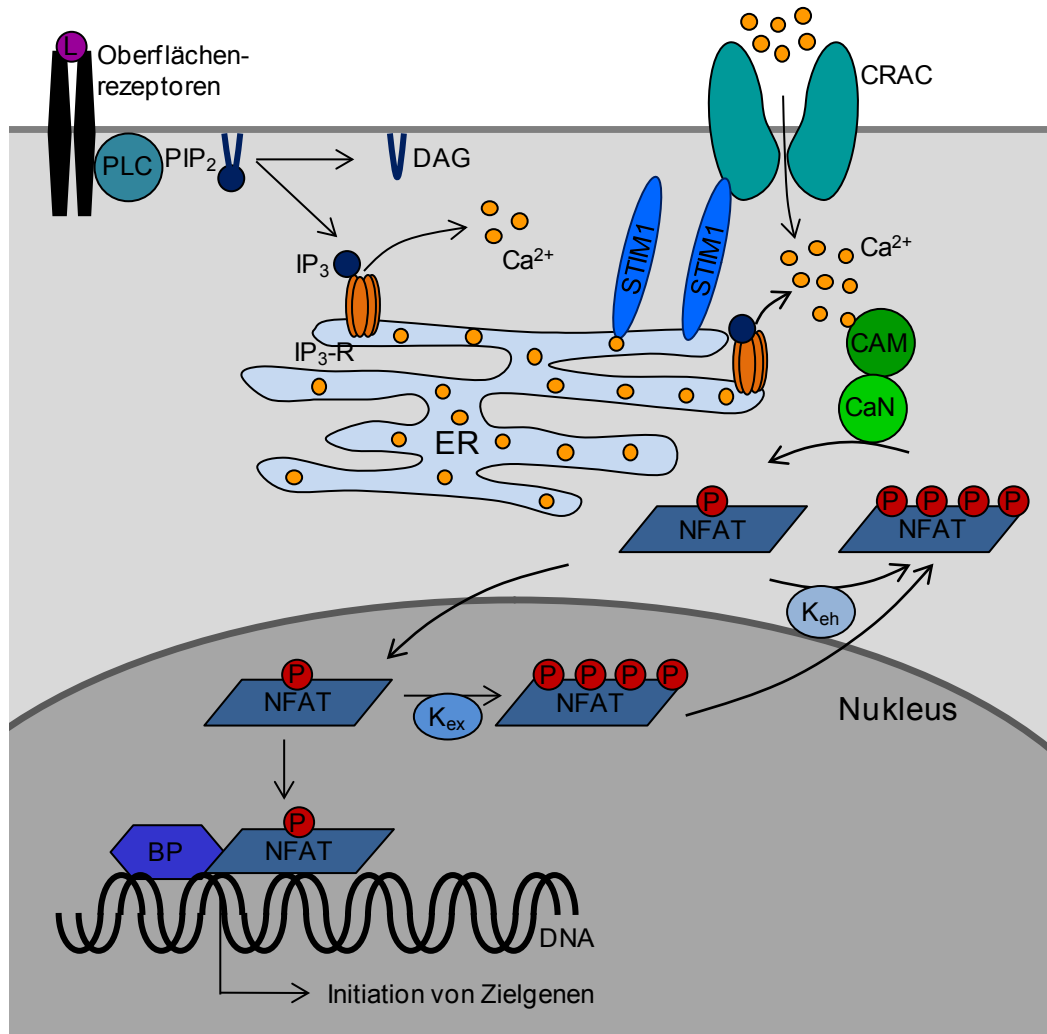


Abb. 3.11: Schematische Darstellung der NFAT-Regulation

Bindet und stimuliert ein Ligand (L) seinen spezifischen Oberflächenrezeptor, der die Phospholipase C (PLC) aktiviert, wird daraufhin die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) katalysiert. IP₃ bindet nun an seinen Rezeptor (IP₃-R), einen Liganden-gesteuerten Calciumionenkanal in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER). Durch dessen Öffnung werden Calciumionen (Ca²⁺) aus dem ER freigesetzt und folglich die intrazelluläre Calciumionenkonzentration ([Ca²⁺]_i) initial erhöht. Die abnehmende Calciumionenkonzentration im ER wird von dem Calcium-sensitiven Protein STIM1 (engl.: „stromal interaction molecule 1“) registriert und über eine Konformationsänderung werden Speicher-operierte Calciumionenkanäle (SOC) geöffnet. So kommt es zu einem anhaltenden Calciumioneneinstrom aus dem Extrazellulärraum, wodurch die [Ca²⁺]_i weiterhin erhöht bleibt. Die Calciumionen binden an Calmodulin (CAM), das wiederum die Phosphatase Calcineurin (CaN) bindet und sie so aktiviert. Calcineurin katalysiert die Dephosphorylierung multiple phosphorylierter NFAT Proteine, die auf diese Weise aktiviert und in den Zellkern transloziert werden. Hier können sie mit anderen Bindungspartnern (BP) interagieren und über die Bindung an die Promoterregionen ihrer Zielgene deren Transkription initiieren. Nach der Phosphorylierung durch Exportinasen (K_{ex}) wird NFAT aus dem Zellkern in das Zytosol transportiert, wo es erneut durch Calcineurin aktiviert werden kann. Im Zytosol befindliche Erhaltungskinasen (K_{eh}) können den Transkriptionsfaktor zusätzlich phosphorylieren und so seine Aktivierung verhindern.

3.5.3 Interaktion von NFAT mit anderen Transkriptionsfaktoren

Aktivierte NFAT Proteine können im Zellkern mit anderen Transkriptionsfaktoren oder sich selbst interagieren und die DNA als Monomere, Dimere oder als kooperative Komplexe binden (Giffin et al. 2003; Stroud et al. 2003). Bei der T-Zell-Aktivierung ist der Transkriptionsfaktor Aktivatorprotein 1 (AP-1), welcher aus Jun-Jun, Jun-Fos oder Jun-Atf Homo- oder Heterodimeren besteht (Vesely et al. 2009), der Hauptbindungspartner von NFAT (Jain et al. 1992; Macian 2005). Für die Interaktion der beiden Transkriptionsfaktoren ist nicht nur die Calciumionen-abhängige Aktivierung von NFAT Voraussetzung, sondern auch die Aktivierung der MAPK-Signaltransduktionskaskade, durch die eine Expression von Fos und Jun induziert wird (Chang et al. 2001). Es konnte gezeigt werden, dass durch die Ausbildung eines NFATc2:AP-1:DNA Komplexes die Stabilität im Vergleich zu einem Komplex, der nur aus NFATc2 und DNA besteht, um etwa das 20-fache erhöht wird (Jain et al. 1993a; Jain et al. 1993b; Rao et al. 1997). Die Bildung eines NFAT:AP-1:DNA Komplexes ist daher wichtig für die Expression vieler Gene; in Abwesenheit von AP-1 werden dagegen andere Gene durch NFAT induziert (Macián et al. 2002). Neben AP-1 kann NFAT jedoch auch mit vielen anderen Transkriptionsfaktoren interagieren, unter anderem mit den Proteinen Maf, ICER und p21^{SNFT}, die zur gleichen bZIP (engl.: „basic region leucine zipper“) Familie gehören wie AP-1 (Ho et al. 1996; Bodor et al. 2000; Bower et al. 2002). Außerdem können z.B. die Zinkfinger Proteine GATA-2, GATA-3, EGR1 und EGR4 (Musrò et al. 1999; Avni et al. 2002; Decker et al. 2003), die Helix-Turn-Helix Proteine Oct und IRF4 (Duncliffe et al. 1997; Rengarajan et al. 2002), das MADS-Box Protein MEF2 (Youn et al. 2000) sowie der nukleäre Rezeptor PPAR γ (Yang et al. 2000c), der Th1-spezifische Transkriptionsfaktor T-bet (Lee et al. 2004) oder die sog. CCAAT/Enhancer-Binding-Proteine (C/EBP) (Yang et al. 2003; Oh et al. 2010) Komplexe mit NFAT formen. Die Kooperation mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren erlaubt NFAT, auf unterschiedliche Stimuli jeweils spezifische Gene zu induzieren und so unterschiedliche Signalwege zu aktivieren.

3.5.4 Rolle in Karzinomen

Neben ihrer tragenden Rolle im Immunsystem sind NFAT Proteine auch bei der Regulation von Entwicklungsprozessen beteiligt, z. B. in der Osteoklastogenese oder der Entwicklung des kardiovaskulären Systems (Graef et al. 2001; Chang et al. 2004; Hirotani et al. 2004). Außerdem sind sie an der Proliferation und Apoptose von Epithelzellen, Fibroblasten und Adipozyten beteiligt (Buchholz et al. 2007). Ihre Beteiligung an der Regulation dieser wichtigen Zellprozesse macht ihr onkogenes

Potential deutlich. Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass sie durchaus zur Entwicklung und Malignität von Tumoren beitragen können (Buchholz et al. 2007). So konnte in Fibroblasten durch die Expression einer konstitutiv aktiven NFATc1 Mutante deren Differenzierung verhindert werden, stattdessen wurde eine Transformation eingeleitet. Die Zellen verloren ihre Wachstumsinhibition beim Kontakt mit anderen Zellen, brauchten weniger Serum zum Wachsen und konnten Kolonien in semiflüssigen Medien bilden (Neal et al. 2003). In Proben aus Pankreaskarzinomen sowie in Pankreaskarzinom-Zelllinien konnte NFATc1 im Kern nachgewiesen werden, während in gesundem exokrinen Pankreasgewebe deutlich weniger NFATc1 im Nukleus vorhanden war. Die Proliferation von Pankreaskarzinom-Zelllinien konnte durch eine Herunterregulation von NFATc1 mittels spezifischer siRNA inhibiert werden (Adeniran et al. 2006; Buchholz et al. 2006). Daneben spielt auch NFATc2 eine Rolle im Pankreaskarzinom, indem es die Resistenz gegen Gemcitabin, einem zytostatisch wirksamen Analogon des Nukleosids Cytidin, durch die Verhinderung von Apoptose fördert (Griesmann et al. 2013). In Zelllinien von Mamma- und Kolonkarzinomen konnte gezeigt werden, dass NFATc2 die Migration und Invasion dieser Zellen fördert (Jauliac et al. 2002). Beim Mammakarzinom wird darüber hinaus auch eine Beteiligung von NFAT bei der Tumorangiogenese diskutiert. In diesen Karzinomzellen konnte durch eine Herunterregulation von NFATc3 eine durch den Angiogenese Faktor SFRP2 (engl.: „secreted frizzled-related protein 2“) ausgelöste Ausbildung von Endothelzellröhren inhibiert werden und der Calcineurin-Inhibitor Tacrolimus konnte die Angiogenese sowohl *in vitro* als auch *in vivo* blockieren (Siamakpour-Reihani et al. 2011). Jedoch ist eine Aktivierung von NFAT nicht immer mit einem maligneren Phänotyp verbunden. In NIH 3T3 Fibroblasten konnte eine verkürzte und konstitutiv im Zellkern lokalisierte Mutante von NFATc2 im Gegensatz zu der von NFATc1 keine Zelltransformation hervorrufen und sogar die Zellproliferation inhibieren (Robbs et al. 2008). Die Rolle von NFAT in Karzinomen ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausreichend verstanden und daher Gegenstand von vielen weiteren Studien.

3.5.5 Zielgene

Der Mechanismus, über den der Transkriptionsfaktor NFAT seine Wirkungen in einer Zelle ausübt, wird über die Initiation und Synthese seiner Zielgene bestimmt. Im Folgenden sollen daher ausgewählte Zielgene, die in der vorliegenden Arbeit eine Rolle spielen, kurz vorgestellt werden.

3.5.5.1 c-Myc

Das Proto-Onkogen *MYC* ist auf Chromosom 8 lokalisiert und kodiert für den Transkriptionsfaktor c-Myc, der an der Regulation von etwa 10 bis 15 % aller humanen Gene beteiligt ist (Dang et al. 2006; Knoepfler 2007). Die Zielgene von c-Myc sind in Zellzyklusprozesse, Zelladhäsion, Überlebensmechanismen und Stoffwechselprozesse involviert (Dang et al. 2006). In vielen Krebsarten spielt die Deregulation des Transkriptionsfaktors, z. B. die konstitutive Expression auf Grund einer chromosomalen Translokation oder Amplifikation, eine wichtige Rolle (Spencer et al. 1991). Dass *MYC* ein direktes Zielgen von NFAT ist, konnte bei Studien in Pankreaskarzinom-Zelllinien gezeigt werden (Buchholz et al. 2006). Hier wurden bei Sequenzanalysen des *MYC*-Promoters 15 potentielle NFAT-Bindungsstellen identifiziert und aktives NFATc1 war an ein spezifisches Element des *MYC*-Promoters gebunden. Die Expression von c-Myc wurde dadurch gesteigert und erhöhte die Malignität der Tumoren (Buchholz et al. 2006).

3.5.5.2 Regulator von Calcineurin 1

Das humane *Regulator von Calcineurin 1* (engl.: „*Regulator of Calcineurin 1*“, *RCAN1*)-Gen ist auf Chromosom 21 lokalisiert und wurde initial als „*Down syndrome critical region 1*“ (*DSCR1*) bezeichnet (Fuentes et al. 1995). Der Name des Proteins wurde von dem „HUGO Gene Nomenclature Committee“ auf „Regulator of Calcineurin 1“ (*RCAN1*) festgelegt, dennoch werden auch die Synonyme „Down syndrome candidate region 1“ (*DSCR1*), „modulatory calcineurin interacting protein 1“ (*MCIP1*), *Adapt 78* oder *Calcipressin 1* verwendet (Harris et al. 2005). Das *RCAN1*-Gen (Abb. 3.12) besteht aus sieben Exons, wovon die ersten vier Exons als alternative erste Exons dienen, wogegen das fünfte, sechste und siebte Exon in allen mRNA-Isoformen enthalten sind (Fuentes et al. 1997). Die große Mehrheit dieser Transkripte sind *RCAN1.1* und *RCAN1.4*, die entsprechend das erste oder das vierte Exon tragen. Nur die Expression der *RCAN1*-Isoform *RCAN1.4* kann durch den Transkriptionsfaktor NFAT induziert werden. Sie steht unter der Kontrolle eines Promoters mit 15 Bindungsmotiven für NFAT (Yang et al. 2000a). Außerdem enthält dieser fünf Bindungsmotive für den Transkriptionsfaktor AP-1 (Zhao et al. 2008).

RCAN1 auf Chromosom 21

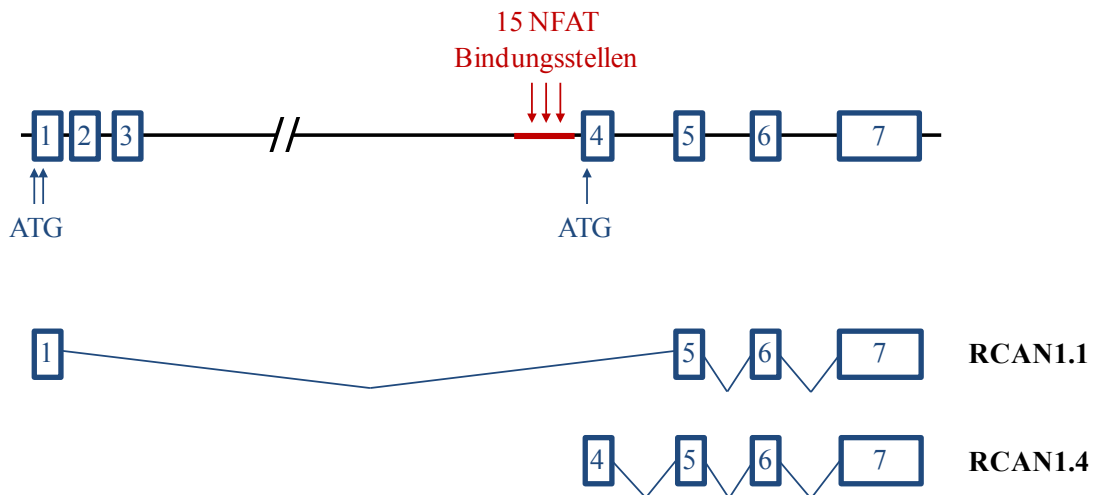


Abb. 3.12: Das humane *RCAN1*-Gen

Intron/Exon Struktur des humanen *RCAN1*-Gens mit 7 Exons (oben). Die Exons 1 und 4 dienen als alternative Start-Exons, woraus die Transkripte RCAN1.1 bzw. RCAN1.4 resultieren (unten). Abbildung modifiziert nach Holmes et al. (Holmes et al. 2010).

Die Expression von RCAN1.4 dient vermutlich als negativer Rückkopplungsmechanismus des Calcineurin/NFAT-Signalweges, da RCAN1 Proteine an die Phosphatase Calcineurin binden und diese dadurch inhibieren (Fuentes et al. 2000; Kingsbury et al. 2000; Rothermel et al. 2000). Nach einer Phosphorylierung scheinen sich die Eigenschaften von RCAN1 zu verändern. Allerdings existieren hierzu teilweise kontroverse Daten. In einigen Studien wird die Calcineurin-Inhibition verstärkt (Genescà et al. 2003), in anderen verhindert die Phosphorylierung die Calcineurin-Inhibition (Lin et al. 2003).

Bei den neurodegenerativen Erkrankungen Morbus Alzheimer und Trisomie 21 wurde eine erhöhte Expression von RCAN1 festgestellt (Harris et al. 2005). Die Überexpression von RCAN1 bei Patienten mit Trisomie 21, die durch das Vorliegen eines dritten Chromosom 21 verursacht wird, ist mit einer signifikant reduzierten Krebsinzidenz fast aller solider Tumoren in Verbindung gebracht worden (Baek et al. 2009). Darüber hinaus hat eine veränderte Expression von RCAN1 Einfluss auf die Zellproliferation, wobei in unterschiedlichen Systemen teilweise gegenteilige Effekte beobachtet wurden. In Endothelzellen konnte durch die Überexpression von RCAN1.4 ein G_{0/1}-Arrest induziert werden (Minami et al. 2004), wogegen die Deletion von RCAN1 in einem Mausmodell das Tumorstadium verlangsamen konnte (Ryeom et al. 2008). In Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien konnte eine induzierte Expression von RCAN1 die Zellmigration inhibieren (Espinosa et al. 2009).

3.5.5.3 Cyclooxygenase 2

Das Enzym Cyclooxygenase 2 (Cox-2), auch als Prostaglandin Endoperoxid Synthase 2 (PGES2) bezeichnet, ist die induzierbare Isoform der Cyclooxygenase (Cox). Indem Cox die Bildung von Prostanoiden katalysiert, ist sie ein Schlüsselenzym des Arachidonsäurestoffwechsels (Abb. 3.13).

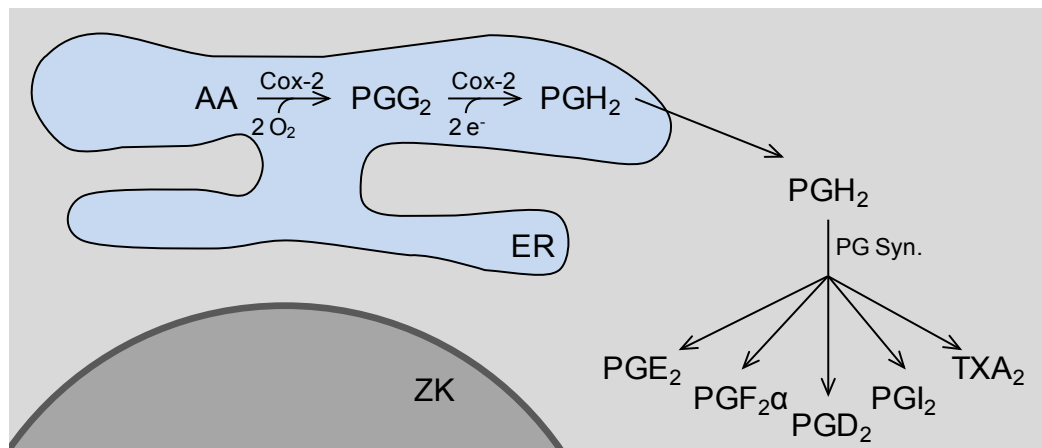


Abb. 3.13: Enzymatische Aktivität von Cox-2 im Arachidonsäurestoffwechsel

Im endoplasmatischen Retikulum (ER) wird Arachidonsäure (AA) durch Cox-2 zu Prostaglandin G₂ (PGG₂) oxidiert und dieses anschließend zu dem instabilen Intermediat Prostaglandin H₂ (PGH₂) Cox-2-abhängig reduziert. PGH₂ dient als Substrat für Zell-spezifische Prostaglandin Synthasen (PG Syn.) im Zytosol, welche die Reaktion zu Prostaglandin E₂ (PGE₂), Prostaglandin F₂α (PGF₂α), Prostaglandin D₂ (PGD₂), Prostacyclin (PGI₂) und Thromboxan (TXA₂) katalysieren. ZK: Zellkern

Im Gegensatz zur konstitutiv exprimierten Cyclooxygenase 1 (Cox-1) wird Cox-2 im gesunden Gewebe nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß exprimiert (Otto et al. 1995). Die Expression von Cox-2 wird bei Entzündungen oder anderen Schädigungen von Gewebe, z. B. durch Wachstumsfaktoren, induziert, wobei die durch sie gebildeten Prostaglandine die Entzündungsreaktion aufrecht erhalten oder sogar verstärken. In der Promotorregion von Cox-2 sind viele putative Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren enthalten, unter anderem für das cAMP-responsible Element Bindeprotein (engl.: „cAMP response element-binding protein“, CREB), das Aktivatorprotein 1 (AP-1) oder die sog. CCAAT/Enhancer-Binding-Proteine (C/EBP) (Kraemer et al. 1992; Rizzo 2011). Auch für den Transkriptionsfaktor NFAT sind hier zwei putative Bindungsstellen enthalten (Iñiguez et al. 2000). Interessanterweise ist die Expression von Cox-2 sowie von Prostaglandinen in vielen Krebsarten erhöht (Fujita et al. 1998; Mendes et al. 2009) und wird in Verbindung gebracht mit erhöhter Proliferation, Angiogenese und Tumordinvasion sowie einer Apoptoseresistenz (Iñiguez et al. 2003; Corcoran et al. 2005; Mendes et al. 2009).

3.6 Metallothioneine

Metallothioneine (MT) sind kleine, Cystein-reiche intrazelluläre Proteine mit einer hohen Affinität für zweiwertige Schwermetalle. Ihre Funktion ist bisher nicht eindeutig geklärt, scheint jedoch vielfältig zu sein. Sie schützen vor oxidativem Stress, indem sie reaktive Sauerstoffradikale binden (Li et al. 2004; Baird et al. 2006), sind an der Homöostase von Zink beteiligt und haben einen protektiven Effekt gegen toxische zweiwertige Schwermetalle wie z. B. Cadmium (Park et al. 2001). Außerdem sind sie in Immunabwehrmechanismen (Lynes et al. 1993; Crowthers et al. 2000), Angiogenese (Miyashita et al. 2005) sowie Zellzyklus (Włostowski 1993; Lim et al. 2009) und Zelldifferenzierung (Cherian et al. 2003) involviert.

Beim Menschen existieren zehn verschiedene funktionelle Proteine, die in vier Gruppen unterteilt werden: MT1, MT2, MT3 und MT4. Derzeit sind MT1 und MT2 am besten charakterisiert, diese werden ubiquitär exprimiert und bei oxidativem Stress oder Entzündungsprozessen durch radikale Sauerstoff- oder Stickstoffverbindungen, Metalle, Glukokortikoide, Katecholamine und pro-inflammatorische Zytokine zusätzlich induziert. Während MT2 nur von einem einzigen Gen kodiert wird, existieren mindestens 11 verschiedene *MTI*-Gene, wovon die sieben Protein-Varianten MT1A, MT1B, MT1E, MT1F, MT1G, MT1H und MT1X funktionell sind. Diese bestehen alle aus 61 Aminosäuren, wovon ein Drittel Cysteine (Cys) sind, die charakteristische Cys-X-Cys, Cys-X-Cys-Cys oder Cys-X-Y-Cys Motive formen. Zur Ausbildung ihrer dreidimensionalen Struktur ist die Bindung von Metallionen nötig, wodurch ein Molekül mit einer C-terminalen α -Domäne sowie einer N-terminalen β -Domäne entsteht, die über eine kurze Brückenregion verbunden sind (Abb. 3.14). Die α -Domäne bindet dabei vier bivalente oder sechs monovalente Metallionen, die β -Domäne kann dagegen drei bivalente oder sechs monovalente Metallionen enthalten. Gebunden werden können unter anderem Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Ag^{1+} sowie Au^{1+} (Sabolić et al. 2010), wobei unter physiologischen Bedingungen vor allem Zn^{2+} enthalten ist.

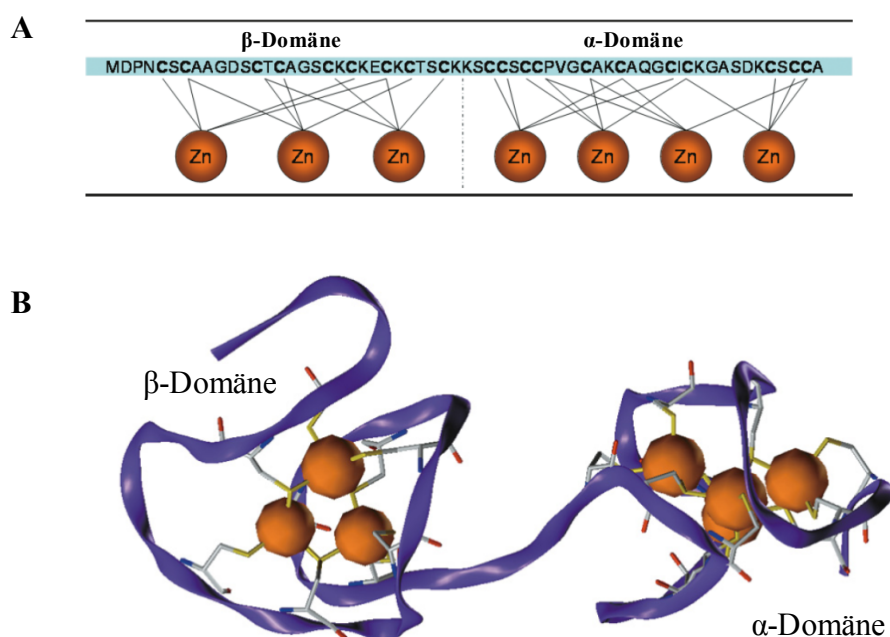


Abb. 3.14: Struktur von humanem Metallothionein

(A) Schematische Illustration der Primärstruktur des humanen MT2A, wobei jeder der 20 Cystein-Reste an der Bindung von ein oder mehreren Zinkionen und somit an der Ausbildung der Zink-Thiolat Cluster beteiligt ist. (B) Kristallstruktur von MT2A (lila), das sieben Zinkionen gebunden hat (orange). Abbildung modifiziert nach Eibl et al. (Eibl et al. 2010).

In Arbeiten von Nowak et al. sowie Bäck et al. konnte gezeigt werden, dass das Metallothionein MT1X in einer Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie sowie in primären Thyreozyten TSH-abhängig induziert wird (Nowak 2005; Bäck 2009). Zur physiologischen Bedeutung von MT in der Schilddrüse ist erst wenig bekannt. Im Vordergrund könnte der Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies stehen, die bei der Iodid-Oxidation entstehen. Die Rolle von MT in der Schilddrüse lässt sich daran ablesen, dass die Expression von MT bei Schilddrüsenerkrankungen wie Morbus Basedow (Ruiz-Riol et al. 2012) oder Schilddrüsenkarzinomen (Huang et al. 2001; Ferrario et al. 2008; Królicka et al. 2010) verändert ist.

3.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Der humane Thyreotropin-Rezeptor (TSH-R) ist der wichtigste Regulator für das Wachstum und die Differenzierung der Schilddrüse. Nach seiner Stimulation werden G-Proteine aller vier Familien aktiviert und über $G\alpha_s$ -abhängige Signalwege werden Schilddrüsenepithelzellen zu nicht-malignem Wachstum angeregt. Einige Befunde deuten darauf hin, dass $G\alpha_{q/11}$ -vermittelte Signalwege und eine folgende Aktivierung der Phospholipase C und Proteinkinase C in maligne Prozesse involviert sein könnten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, $G_{\alpha_{q/11}}$ -abhängige Effektoren des TSH-R in humanen Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien zu identifizieren und näher zu charakterisieren. Dazu sollte eine follikuläre Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie verwendet werden, die den humanen TSH-R überexprimiert und die erhaltenen Ergebnisse dann in einem Zellsystem mit endogenem TSH-R überprüft werden. Da fast alle kommerziell erhältlichen permanenten Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien nicht auf eine funktionelle Expression des TSH-R untersucht sind oder diesen nicht exprimieren, sollte aus verschiedenen humanen follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien diejenigen mit funktionellem TSH-R ermittelt werden.

Bei der Aktivierung von $G_{\alpha_{q/11}}$ -vermittelten Signalwegen ist die Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ ein initiales Ereignis. Diese sollte nach einer Aktivierung des TSH-R mittels seines Liganden TSH zuerst überprüft werden. Anschließend sollte analysiert werden, ob der Calcium-regulierte Transkriptionsfaktor NFAT (engl.: „nuclear factor of activated T cells“) TSH-vermittelt aktiviert wird. Bei einer NFAT Aktivierung sollte auch die Expression von NFAT-induzierten Zielgenen nach einer Stimulation der Zellen mit TSH untersucht werden. Hierbei sollte der Signalweg von der Aktivierung des TSH-R bis zur Expression der Zielgene mit allen beteiligten Effektoren genau analysiert werden. Im Besonderen sollte dabei die Rolle der $G_{q/11}$ - und $G_{i/o}$ Proteine charakterisiert werden, da eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ neben $G_{q/11}$ auch durch den $\beta\gamma$ -Komplex anderer G-Protein Familien, vor allem $G_{i/o}$, erfolgen kann. Dazu sollten spezifische siRNAs gegen $G_{q/11}$ und der $G_{i/o}$ -Inhibitor Pertussis Toxin (PTX) verwendet werden. Im Fall einer $G_{q/11}$ -Abhängigkeit sollte darüber hinaus, soweit möglich, auch die Funktion des oder der Zielgene und damit der NFAT-Aktivierung identifiziert werden.

Außerdem sollte die aus Vorbefunden aufgezeigte TSH-vermittelte Expression von MT1X näher charakterisiert werden. Dabei sollte analysiert werden, ob die MT1X Induktion ausschließlich von einer $G_{\alpha_{q/11}}$ -Aktivierung abhängt oder ob hier auch andere G-Proteine beteiligt sind.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav „VARIOKLAV [®] Dampfsterilisator“	HP Medizintechnik, Oberschleißheim
Calcium-Imaging-System:	
CCD Kamera „Ixon +“	Andor, Belfast, Nordirland
Mikroskop „IX70“	Olympus, Hamburg
Lichtquelle „Polychrome V monochromator“	TILL Photonics, Martinsried
Chemilumineszenz-Detektionssystem „ChemiSmart 5100“	Peqlab, Erlangen
Eismaschine „Flockeneisbereiter F75L“	Wessamat, Kaiserslautern
Heizblock „Blockheizthermostat HX-1“	Peqlab, Erlangen
konfokales Mikroskop „LSM 510 Meta Laser Scanning Microscope“	Zeiss, Jena
Kühlzentrifuge „Fresco 21“	Heraeus, Hanau
Lichtmikroskop „CKX41SF“	Olympus, Hamburg
Magnetrührer „RT Stirring Hotplate SP138720-33“	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Membranpumpe mit Flüssigkeits- Absaugsystem „BVC 21 NT VARIO“	Vacuubrand, Wertheim
Messkammer für Einzelzellmessungen (Mangan-, Quench“)	Feinmechanikwerkstatt FB20 der Philipps-Universität Marburg
Mikrodosierspritze „Hamiltonspritze“ (25 µl, 50 µl, 250 µl)	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Mikrotiterplatten-Lesegerät „FLUOstar Omega“	BMG Labtech, Offenburg
pH-Meter „DIGITAL-pH-METER“	Knick, Berlin
Photometer „Bio Photometer Plus“ dazu: faseroptische Mikro-Küvette „TrayCell [®] “	Eppendorf, Hamburg Hellma Analytics, Müllheim

Material und Methoden

Gerät	Hersteller
Pipetten „Peqette“ (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Peqlab, Erlangen
Pipettierhilfe „pipetus [®] -akku“	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Polyacrylamid-Gel-Transferapparatur „Mini Trans-Blot [®] Electrophoretic Transfer Cell“	BioRad, München
Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System „miniVE Vertical Electrophoresis System“	GE Healthcare, München
Präzisionswaage „HR-202“	A&D Company Limited, Griesheim
Real-Time-PCR-Gerät „LightCycler [®] 480 II“	Roche, Mannheim
Spannungsquelle „Electrophoresis Power Supply – EPS 301“	GE Healthcare, München
Sterilbank „HERAsafe KS18“	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Stickstofftank „Thermo Forma Model 8030 Liquid N2 Storage Tank“	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Taumelschüttler „Polymax 1040“	Heidolph, Schwabach
Thermocycler „Primus 25“	Peqlab, Erlangen
Tiefkühlschrank (-80 °C) „Premium U570“	New Brunswick Scientific (Eppendorf), Hamburg
Vortexer „IKA [®] MS 3 basic“	Ika, Staufen
Waage „L610D“	Sartorius, Göttingen
Wasserbad „WMB 14“	Memmert, Schwabach
Wippe „Duomax 1030“	Heidolph Instruments, Schwabach
Zählkammer „Neubauer Improved“	Brand, Wertheim
Zellkultur-Inkubator „HERAcell 240“	Heraeus, Hanau
Zentrifuge „Biofuge Stratos“	Heraeus, Hanau
Zentrifuge „Labofuge 400“	Heraeus, Hanau
Zentrifuge „Pico 17“	Heraeus, Hanau

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
12-well ³ Zellkulturplatten	Cellstar Greiner Bio-One, Frickenhausen
96-well Mikrotiterplatten (weiß mit Glasboden)	Cellstar Greiner Bio-One, Frickenhausen
96-well Mikrotiterplatten (weiß mit weißen Boden)	Cellstar Greiner Bio-One, Frickenhausen
96-well Platten für qPCR	Roche, Mannheim
Elektroden Papier Novablot	GE Healthcare, München
Glasdeckgläser	Menzel, Braunschweig
Migrationskammer, fluoreszenzdicht (FluoroBlok TM Cell Culture Insert)	BD Biosciences, Heidelberg
Nitrocellulosemembran Protan [®] BA85(<i>Hybond extra</i> , 0,45 µm)	Whatman GmbH, Dassel
Objektträger, Mattrand	Menzel, Braunschweig
Pasteurpipetten	Carl Roth, Karlsruhe
Szintillations-Gefäße, 20 ml	Packard, Groningen, Niederlande

Alle nicht aufgeführten Verbrauchsmaterialien wurden von Sarstedt, Nümbrecht bezogen

4.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Versuchskits

Substanz	Herkunft
A23187	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
ATP (Adenosin-5'-triphosphat)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
BIM X (Bisindolylmaleinimid X)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bradykinin	BioTrend, Zürich, Schweiz
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Carbachol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

³ Da für „well“ im Deutschen keine adäquate Übersetzung existiert, wurde in diesem Fall ausnahmsweise der englische Fachbegriff beibehalten. Als „well“ wird eine einzelne Reaktionseinheit auf einer Platte bezeichnet, die am zutreffendsten als „Kavität“, „Näpfchen“ oder „Schälchen“ übersetzt werden kann.

Material und Methoden

Substanz	Herkunft
cDNA Synthese Kit („RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit“)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
Coelenterazin	Innoprot, Bizkaia, Spanien
Cycloheximid	Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA
Cyclosporin A (CsA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth, Karlsruhe
DTT (Dithiothreitol)	AppliChem, Darmstadt
EGTA (Ethylendioxy-bis-(ethylenitrilo)-tetraessigsäure)	Carl Roth, Karlsruhe
FCS (Fetal Bovine Serum)	Invitrogen, Karlsruhe
FK 506 (Tacrolimus)	Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA
Fluoreszenz-Eindeckmedium („Dako Cytomation Fluorescent Mounting Medium“)	Dako Cytomation, Hamburg
Fluoreszenz-Eindeckmedium mit DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindol) („VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI“)	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Forskolin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Fura-2/AM	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Gly-His-Lys Acetat (Leberzellen-Wachstumsfaktor)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
INCA-6	Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA
Insulin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
ITS Liquid Media Supplement (100x)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Lipofectamine® RNAiMax Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Luciferin („Luciferase Assay System“)	Promega, Mannheim
Luminol (3-Aminophtalhydrazid)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Material und Methoden

Substanz	Herkunft
Molekulargewichtsmarker, 10 - 170 kDa („PageRuler Prestained Protein Ladder“)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Nuklease-freies H ₂ O	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Paraformaldehyd (PFA), 16 %	Electron Microcopy Science, Hatfield (Shah et al. 2003)
Pertussis Toxin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA)	Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA
Poly-L-Lysin Hydrobromid (30 000 - 70 000 Da)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PromoFectin	PromoKine, Heidelberg
RotiBlock 10x	Carl Roth, Karlsruhe
Rp-cAMPS	Enzo Life Sciences, Lörrach
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth, Karlsruhe
SKF-96365	Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA
Somatostatin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
SuperSignal [®] West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
SYBR Green („Absolute SYBR Capillary Mix“)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
SYBR Green („LightCycler [®] 480 SYBR Green I Master“)	Roche, Mannheim
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Carl Roth, Karlsruhe
TO-PRO [®] -3	Invitrogen, Karlsruhe
Transferrin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TriReagent [®]	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Triton [®] X-100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypsin (0,05 % mit EDTA)	Invitrogen, Karlsruhe
TSH (bovin)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tween [®] 20	Carl Roth, Karlsruhe
U0126	Calbiochem, Darmstadt
XTT-Reagenz („Cell Proliferation Kit II (XTT“)	Roche, Mannheim
Zinkchlorid (ZnCl ₂)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Material und Methoden

Substanz	Herkunft
β -Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
ϵ -Aminocapronsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
2-Aminoethoxydiphenylboran (2-APB)	Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA
[3 H]-Adenin	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim
Standardchemikalien stammen, sofern nicht anders angegeben, von Carl Roth, Karlsruhe.	

4.1.4 Zellkultur

4.1.4.1 Zellkulturmedien

Artikel	Hersteller
Coon's modification of Ham's F12 media, supplemented with glutamine, 6 hormones and 5% fetal bovine serum	Cell Lines Service, Eppelheim
MCDB 105 Medium (Pulver)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Alle nicht aufgeführten Zellkulturmedien wurden von der Firma Invitrogen, Karlsruhe bezogen.	

4.1.4.2 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung/Herkunft
CGTH-W-1	Brustbeinmetastasen eines follikulären Schilddrüsenkarzinoms einer weiblichen chinesischen Patientin von 70 Jahren (Lin et al. 1995). Die Zellen wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bestellt.
FTC 133 wt TSH-R (<i>follicular thyroid carcinoma cell line 133 with wild type TSH-receptor</i>)	Humane Zelllinie aus Lymphknotenmetastasen eines follikulären Schilddrüsenkarzinoms eines männlichen Patienten von 42 Jahren (Goretzki et al. 1990; Rao et al. 2005), die stabil mit dem humanen TSH-Rezeptor transfiziert worden sind (Büch et al. 2008). Die FTC 133 Zellen wurden freundlicherweise von Dr. P. E. Goretzki (Neuss, Germany) zur Verfügung gestellt.
HTC 238	Lungenmetastasen eines follikulären Schilddrüsenkarzinoms desselben Patienten wie die FTC 133 Zellen (Goretzki et al. 1990). Die Zellen wurden ebenfalls von Dr. P. E. Goretzki zur Verfügung gestellt.

Material und Methoden

Zelllinie	Beschreibung/Herkunft
ML-1	Etabliert aus rezidivem Tumorgewebe eines dedifferenzierten follikulären Schilddrüsenkarzinoms einer weiblichen Patientin von 50 Jahren (Schönberger et al. 2000). Die Zellen wurden von der DSMZ bezogen.
RO82-W-1	Etabliert aus Metastasen einer weiblichen Patientin mit mikrofollikulärem Schilddrüsenkarzinom (Estour et al. 1989). Die Zellen wurden bei der Interlab Cell Line Collection (ICLC, Genua, Italien) bestellt.
SD 171 & SD 197	Primäre humane Thyreozyten-Zelllinien, etabliert aus operativ entfernten Schilddrüsen von Patienten mit Morbus Basedow (Bäck et al. 2013). Die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Heike Biebermann zur Verfügung gestellt.
TT2609 C02	Zelllinie aus Tumorgewebe eines 57-jährigen Kaukasiers mit lokal wiederaufgetretenem follikulären Schilddrüsenkarzinom (Geldof et al. 2001). Die Zellen stammten von der DSMZ.

4.1.5 Primer

humane Primer	Sequenz	Länge des Amplifikats
β-Aktin	5'-ccaaccgcgagaagatga-3' 5'-ccagaggcgtacagggatag-3'	97 nt
Autotaxin	5'-gcacatcgaattaagagagcag-3' 5'-gggggagtctgatagcactg-3'	66 nt
c-Fos	5'-ctaccactcacccgcagact-3' 5'-aggtccgtgcagaagtct-3'	72 nt
c-Jun	5'-ccaaaggatagtgcgatgtt-3' 5'-ctgtccctctccactgcaac-3'	62 nt
c-Myc	5'-caccagcagcagactctga-3' 5'-gatccagactctgacctttgc-3'	102 nt
Cox-2	5'-cttcacgcacatcagttttcaag-3' 5'-tcaccgtaaataatgatttaagtccac-3'	96 nt
Gα ₁₁	5'-gcatccaggaatgctacgac-3' 5'-ggccaacgtcggtcaggtag-3'	78 nt
Gα _q	5'-tggtgtatcagaacatcttcacg-3' 5'-ctcgaactaattgtgcatgagc-3'	111 nt

Material und Methoden

humane Primer	Sequenz	Länge des Amplifikats
MT1X	5'-cttctcctgcctcgaaatg-3' 5'-acaggcacaggagccaac-3'	62 nt
NFATc1	5'-caaggtcattttcgtggagaa-3' 5'-caggtcccggtcagtttc-3'	76 nt
NFATc2	5'-tgaccagacactacttgatg-3' 5'-aatggcttctttacgtctgattt-3'	91 nt
NFATc3	5'-ctagagtacgacttgtttcgtgt-3' 5'-tgaggaagttcttgagcagacc-3'	118 nt
NFATc4	5'-ccgagacagtgtccctatcc-3' 5'-tctcgccaatgatctcac-3'	63 nt
RCAN1	5'-tgcgaccccagtcataaact-3' 5'-gcgtgcaattcatactttcc-3'	78 nt
RCAN1.1	5'-gcttcattgactgcgagatg-3' 5'-acgtcctaaagagggactcaaa-3'	132 nt
RCAN1.4	5'-tgtggcaaacagtgatatttca-3' 5'-acgtcctaaagagggactcaaa-3'	68 nt
TSH-R	5'-aaagagctccccctcctaaa-3' 5'-ttggtcaggtcagggaaacat-3'	71 nt
VEGF-A	5'-agtgtgtgcccactgagga-3' 5'-ggtaggtttgatccgcata-3'	60 nt
VEGF-B	5'-ctggccaccagaggaaagt-3' 5'-catgagctccacagtcaagg-3'	98 nt
VEGF-C	5'-cacgagctacctcagcaaga-3' 5'-ctgtaaacatccagtttagacatgc-3'	126 nt

Alle Primer wurden von der Firma Metabion, Martinsried bezogen.

4.1.6 Antikörper

4.1.6.1 Primärantikörper

Primärantikörper	Spezies	Hersteller
Anti-c-Fos (4): sc-52	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Cox-2 (Anti-COX2, C-terminal antibody), SAB4502491	Kaninchen	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Material und Methoden

Primärantikörper	Spezies	Hersteller
Anti-ERK 2 (K-23): sc-153	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-NFATc1 (H-110): sc-13033	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-NFATc2 (Anti-NFAT1 antibody), ab2722	Maus	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Anti-NFATc3 (F1): sc-8405	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-p-ERK (E-4): sc-7383	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-RCAN1 (Anti-DSCR-1 (C-terminal)), D6694	Kaninchen	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

4.1.6.2 Sekundärantikörper, Meerrettich Peroxidase-gekoppelt

Sekundärantikörper	Hersteller
Anti-Maus IgG (A2554)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Anti-Kaninchen IgG (A6154)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

4.1.6.3 Sekundärantikörper, Fluoreszenz-gekoppelt

Sekundärantikörper	Hersteller
Anti-Maus IgG, FITC-gekoppelt	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Anti-Kaninchen IgG, FITC-gekoppelt	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

4.1.7 siRNA

siRNA	Sequenz
Kontroll-siRNA (4390843)	unbekannt
G α_q (I) (HSS104237)	5'-CCCUUUGACUUACAAAGUGUCAUUU-3' 3'-GGGAAACUGAAUGUUUCACAGUAAA-5'
G α_q (II) (HSS104236)	5'-GGAGAGAGUGGCAAGAGUACGUUUA-3' 3'-CCUCUCUCACCGUUCUCAUGCAAU-5'
G α_{11} (I) (HSS178464)	5'-CCGGCAUCAUCGAGUACCCUUUCGA-3' 3'-GGCCGUAGUAGCUCAUGGGAAAGCU-5'

siRNA	Sequenz
Gα ₁₁ (II) (HSS104213)	5'-GCAUCAGUACGUCAGUGCCAUCAAG-3' 3'-CGUAGUCAUGCAGUCACGGUAGUUC-5'
RCAN1 (I) (4427037, ID: s4318)	5'-CCAUGUAUGUGAGAGUGAUtt-3' 3'-caGGUACAUACACUCUCACUA-5'
RCAN1 (II) (4427037, ID: s4319)	5'-CAUAAACUAUGAUCUCUUAAtt-3' 3'-caGUAUUUGAUACUAGAGAAU-5'
RCAN1 (III) (4427037, ID: s4320)	5'-GGACUGUCUUGAGAAAACAtt-3' 3'-acCCUGACAGAACUCUUUUGU-5'

Alle siRNAs wurden von der Firma Invitrogen, Karlsruhe bezogen.

4.1.8 Vektoren/Plasmide

Plasmid	Quelle
NFATc3-eGFP DNA-Konstrukt (pEGF-C1-NFAT4a)	Das Plasmid wurde freundlicherweise von Yuriy M. Usachev, Ph.D., University of Iowa, USA zur Verfügung gestellt (Ulrich et al. 2012)
NFAT-Reportergenkonstrukt (pGL4.30[luc2P/NFAT-RE/Hygro])	Promega, Mannheim
Renilla-Reportergenkonstrukt (pGL4.74[hRluc/TK])	Promega, Mannheim

4.1.9 Lösungen und Puffer

4.1.9.1 Standardlösungen und Puffer

PBS 137 mM NaCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ mit HCl auf pH 7,4 eingestellt	PBS-T PBS mit 0,1 % TWEEN [®] 20
TBS 150 mM NaCl 20 mM Tris mit HCl auf pH 7,6 eingestellt	TBS-T TBS mit 0,1 % TWEEN [®] 20

4.1.9.2 Lösungen und Puffer für proteinbiochemische Methoden

SDS-Sammelgel Puffer (4x)

500 mM Tris-HCl, pH 6,8
0,4 % SDS

SDS-Trenngel Puffer (4x)

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
0,4 % SDS

Trenngellösung (9 % Acrylamid)

4,2 ml 30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid
3,5 ml SDS-Trenngel Puffer (4x)
6,3 ml H₂O (entmineralisiert)

Trenngellösung (12 % Acrylamid)

8 ml 30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid
5 ml SDS-Trenngel Puffer (4x)
7 ml H₂O (entmineralisiert)

Trenngellösung (19 % Acrylamid)

9,5 ml 30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid
3,75 ml SDS-Trenngel Puffer (4x)
1,75 ml H₂O (entmineralisiert)

Sammelgellösung (3,9 % Acrylamid)

2 ml 30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid
2,5 ml SDS-Sammelgel Puffer (4x)
6,3 ml H₂O (entmineralisiert)

Lämmli (2x)

125 mM Tris-HCl, pH 6,8
20 % Glycerol
4 % SDS
2 % β -Mercaptoethanol
10 μ g/ml Bromphenolblau

DTT-haltiger Lysepuffer

62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8
10 % Glycerol
2 % SDS
50 mM DTT
0,01 % Bromphenolblau

SDS Laufpuffer

25 mM Tris
187 mM Glycin
1 % SDS

SDS Transferpuffer

25 mM Tris
187 mM Glycin
0,2 % SDS
20 % Methanol

Luminol Stocklösung

250 mM Luminol
in DMSO

ECL-Stabilisator Lösung

114 mM ϵ -Aminocapronsäure
in DMSO

ECL-Substrat 1

1 % Luminol-Stocklösung
0,44 % Stabilisator-Stocklösung
100 mM Tris-HCl, pH 8,5

ECL-Substrat 2

0,018 % H₂O₂
100 mM Tris-HCl, pH 8,5

Ablösepuffer

60 mM Tris-HCl, pH 8,2
2 % SDS
60 mM β -Mercaptoethanol

4.1.9.3 Lösungen und Puffer für molekularbiologische Methoden

DEPC-H₂O

0,1 % DEPC

über Nacht in H₂O (entmineralisiert)

gelöst

autoklaviert

4.1.9.4 Lösungen und Puffer für spezielle Messmethoden und Versuche

HBS

140 mM NaCl

5 mM KCl

1 mM MgCl₂

10 mM HEPES

mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt

HBS⁺⁺⁺

HBS mit

2 mM CaCl₂

0,1 % BSA

0,1 % Glucose

HBS^{-Ca²⁺}

HBS mit

1 mM EGTA

0,1 % BSA

0,1 % Glucose

hypertoner Lysepuffer für NFAT-Reporterstudie

25 mM Tris-HCl, pH 8,2

4 mM EGTA

8 mM MgCl₂

1 mM DTT

1 % (v/v) Triton[®]-X-100

CFA-Färbelösung

0,25 % 1,9-Dimethylmethylenblau

50 % Ethanol

4.2 Allgemeine Methoden

4.2.1 Zellkultur

In der vorliegenden Arbeit wurde überwiegend mit permanenten humanen Zelllinien gearbeitet, die aus follikulären Schilddrüsenkarzinomgeweben etabliert worden sind. Dabei wurden in erster Linie die FTC 133 wt TSH-R Zellen verwendet, um TSH abhängige Signalwege zu untersuchen. Diese wurden aus FTC 133 Zellen generiert, einer follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie, die als Modellsystem für Untersuchungen zur Signaltransduktion von Schilddrüsenzellen dient. Da diese Zellen jedoch keinen funktionellen TSH-Rezeptor (TSH-R) exprimieren (Demeure et al. 1997), wurde dieser stabil in die FTC 133 Zellen transfiziert und so die Zelllinie FTC 133 wt TSH-R generiert (Büch et al. 2008). Durch die Überexpression des TSH-R lassen sich Rezeptor-abhängige Signalwege leichter untersuchen, da diese in stärkerem Ausmaß aktiviert werden und so leichter nachgewiesen werden können. Außerdem wurden zur Verifikation in einzelnen Versuchen primäre humane Thyreozyten verwendet (Zelllinien SD 171 und SD 197), die aus Schilddrüsengewebe von Patienten mit Morbus Basedow isoliert wurden. Diese genetisch nicht veränderten Zelllinien exprimieren den TSH-R konstitutiv. Zusätzlich wurden verschiedene follikuläre Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien auf die funktionelle Expression eines TSH-R analysiert.

4.2.1.1 Kultivierung der Zellen

Alle Zelllinien wurden in einem Brutschrank bei 37 °C und einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre mit 95 % Luft und 5 % CO₂ kultiviert. Als Zellkulturgefäße dienten Zellkulturflaschen (75 cm², Polystyren (PS), mit Filterkappe) der Firma Sarstedt, in denen sich etwa 15 ml Zellkulturmedium befanden. Die Medien waren vor ihrer Verwendung auf 37 °C erwärmt worden.

Damit sich Zellen kontinuierlich in einer exponentiellen Wachstumsphase befinden, müssen sie regelmäßig mit frischem Zellkulturmedium versorgt werden, außerdem muss ihre Zellzahl in den Kulturgefäßen regelmäßig verringert werden. Die verwendeten Zellen wachsen in einem einschichtigen Zellverband adhärent auf einer zytophilen Grundfläche (Substrat) und müssen schonend aus Standard-Kulturgefäßen überführt werden. Dazu wurde das Nährmedium abgenommen und durch 3 ml Trypsin (0,05 %) mit EDTA ersetzt. Die Zellen wurden etwa 3 Minuten im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit spaltete das Trypsin die zur Anheftung wichtigen Oberflächenproteine. Durch ein anschließendes leichtes „Klopfen“ wurden die Zellen vollständig vom Flaschenboden gelöst und das Trypsin durch die Zugabe von 7 ml Zellmedium, das

Material und Methoden

10 % FCS enthielt, inaktiviert. Nun konnten die Zellen in eine neue Zellkulturflasche überführt oder für nachfolgende Versuche ausgesät werden. Um stabilere Versuchsbedingungen zu generieren und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erhöhen, wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer nach Anleitung ermittelt und anschließend die optimale Zellzahl eingestellt.

Tab. 4.1: Kultivierung der einzelnen Zelllinien

Zelllinie	Medium	Neuaussaat
FTC 133 wt TSH-R	IMDM-Medium, dem zusätzlich 10 % FCS sowie 5 mg/ml Insulin, 5 mg/ml Transferrin und 10 ng/ml Leberzellen-Wachstumsfaktor Gly-His-Lys zugesetzt worden waren („IMDM-Komplettmedium“)	Passage alle 3–4 Tage im Verhältnis 1:8 bis 1:10.
HTC 238	IMDM-Komplettmedium	Passage alle 3–4 Tage im Verhältnis etwa 1:8 bis 1:10.
RO82-W-1	Spezielle Mischung der drei Zellkulturmedien DMEM, Ham's F12 und MCDB 105 („RO82-Spezialmedium“), dem zusätzlich 10 % FCS zugesetzt worden waren. Das MCDB 105 Medium wurde in H ₂ O bidest. angesetzt und sterilfiltriert. Für einen Liter „RO82-Spezialmedium“ wurden 500 ml DMEM-, 250 ml Ham's F12- sowie 250 ml MCDB 105-Medium (Verhältnis 2:1:1) in einer autoklavierten Flasche zusammengeführt.	Passage alle 4–5 Tage im Verhältnis 1:6 bis 1:7.
CGTH-W-1	RPMI 1640-Medium, dem zusätzlich 10 % FCS hinzugefügt worden waren.	Passage alle 2–3 Tage im Verhältnis 1:10.
ML-1	DMEM-Medium, dem zusätzlich 10 % FCS hinzugefügt worden waren.	Wegen langsamer Proliferation Passage alle 1–2 Wochen im Verhältnis 1:2 bis 1:4.
TT2609-C02	RPMI 1640-Medium, dem zusätzlich 10 % FCS, 1 mM Natriumpyruvat und 5 ml ITS Liquid Media Supplement (100x) zugegeben worden war. Das Medium enthielt final 1 mg/ml bovines Insulin, 0,55 mg/ml humanes Transferrin sowie 0,5 µg/ml Natriumselenit.	Passage alle 5 Tage im Verhältnis 1:6.

Zelllinie	Medium	Neuaussaat
SD 171 & SD 197	IMDM-Komplettmedium	Passage alle 5–7 Tage im Verhältnis 1:5. Da SD 171 und SD 197 Zellen nicht immortalisiert sind, konnten sie nach etwa 10–15 Passagen nicht weiter verwendet werden. Ab diesem Zeitpunkt nahm die Verdopplungszeit deutlich ab, bis die Zellen schließlich ihre Proliferation vollständig einstellen.

4.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Bei der Kryokonservierung werden Zellen unter Verwendung von Gefrierschutzsubstanzen langsam eingefroren und bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Als Gefrierschutz wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) in 10 %iger Lösung verwendet. Beim Einfrierprozess verhindert es die Eiskristallbindung und schützt die Zellen.

Für eine Kryokonservierung wurden die Zellen aus einer mindestens 90 % konfluenten Zellkulturflasche mit Trypsin/EDTA gelöst. Anschließend wurde das Trypsin durch die Zugabe von 7 ml Zellmedium mit 10 % FCS inaktiviert. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Röhrchen überführt und für 6 Minuten bei $100 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 4 oder 5 ml Einfriermedium, das aus 90 % FCS und 10 % DMSO bestand, aufgenommen. Nach Resuspension wurde jeweils 1 ml der Zellsuspension in sterile Kryoröhrchen (mit Silikondichtung) abgefüllt. Diese wurden in einem Isopropanoltank (Mr. Frosty, NALGENE) gestellt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Im Tank erfolgte jetzt eine langsame Abkühlung der Zellen auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (ca. $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{Minute}$). Nachdem diese Temperatur erreicht worden war, konnten die Zellen in einen Tank überführt werden, der etwa $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ kalten, flüssigen Stickstoff enthielt. Dies wurde etwa 48 Stunden nach dem Einfrieren durchgeführt.

Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden diese aus dem Stickstofftank entnommen und kurz bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad erwärmt. Sobald die Zellsuspension aufgetaut war, wurde sie in ein 50 ml Röhrchen überführt, in das 9 ml auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmtes Zellmedium vorgelegt worden war. Die Zellen wurden 6 Minuten bei $100 \times g$ zentrifugiert und der Überstand anschließend abgesaugt, um das DMSO zu entfernen. Das Zellpellet wurde in 15 ml frischem Zellmedium aufgenommen und resuspendiert. Zur Kultivierung wurde die Zellsuspension in eine Kulturflasche überführt und im Brutschrank inkubiert.

4.2.1.3 Beschichtung von Zellkulturplatten mit Poly-L-Lysin

Das Homopolymer Poly-L-Lysin kann durch eine Veränderung der Oberflächenladung die Zelladhäsion verbessern. In einigen folgenden Versuchen, in denen die Zellhaftung am Kulturträger von besonderer Bedeutung war, wurde daher zuvor eine Poly-L-Lysin Beschichtung durchgeführt.

Dafür wurden die zu beschichtenden Oberflächen großzügig mit steriler Poly-L-Lysin Lösung (1 % w/v) überschichtet und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgenommen und die Platten mit gefilterter Luft getrocknet. Bis zu ihrer Verwendung wurden sie bei Raumtemperatur gelagert.

4.2.1.4 Transfektionen

Das Einbringen von fremder DNA oder RNA in eine Zelle wird als Transfektion bezeichnet. Humane Zellen können mit verschiedenen Methoden unterschiedlich gut transfiziert werden, z. B. viral, mittels Lipofektion, über Elektroporation oder mit Hilfe der Calcium-Phosphat-Präzipitation. In der vorliegenden Arbeit wurde das Verfahren der Lipofektion angewandt, wobei Nukleinsäuren mit einem Transfektionsreagenz in Liposomen verpackt werden, die mit der Zellmembran fusionieren können oder stabile Komplexe ausbilden, die über Endozytose in die Zelle transportiert werden.

Transfektion von DNA

Für die Transfektion von DNA wurde das Transfektionsreagenz PromoFectin der Firma PromoKine nach Herstellerangaben verwendet, das mit der DNA stabile, kationische, wasserlösliche Komplexe bildet. Diese gelangen und über Endozytose in die Zelle, wo PromoFectin durch das Binden an Protonen den pH Wert im Endosom puffert und so endosomale Nukleasen inhibiert. Der anhaltende Protoneneinstrom führt zum Anschwellen und letztendlich zum Platzen des Endosoms, wodurch die DNA in das Zytoplasma der Zelle freigesetzt wird. Über einen noch unbekannten Mechanismus wird sie zum Zellkern transportiert.

Etwa 6×10^4 FTC 133 wt TSH-R Zellen je well wurden auf einer 6-well Platte ausgesät und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde pro well, die mit DNA transfiziert werden sollte, 1 µg DNA (siehe 4.1.8) mit serumfreiem IMDM-Medium auf ein Volumen von 50 µl gebracht. Außerdem wurden pro Mikrogramm DNA 2 µl PromoFectin in 50 µl serumfreiem IMDM-Medium verdünnt und in das Reaktionsgefäß mit der DNA überführt. Der Ansatz wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, diese Zeit diente der Ausbildung des Komplexes zwischen DNA und Transfektionsreagenz. Dann wurden je well 95 µl des Transfektionsgemisches tröpfchenweise zu den Zellen pipettiert. Im Fall einer

gleichzeitigen Transfektion von zwei verschiedenen DNA-Konstrukten (Doppeltransfektion) wurde je Konstrukt 1 µg DNA eingesetzt und die doppelte Menge an PromoFectin sowie Medium verwendet. Je well wurden dann 190 µl des Transfektionsgemisches tröpfchenweise zu den Zellen pipettiert. Es folgte eine Inkubation im Brutschrank für 4 Stunden bei 37 °C. Anschließend wurde das Zellmedium einschließlich des Transfektionsgemisches vollständig entfernt und durch 1,5 ml IMDM-Komplettmedium ersetzt. Die Zellen konnten nun für weiterführende Versuche (NFAT-Reportergergenstudien, Kerntranslokation eines NFAT-eGFP Fusionsproteins) verwendet werden.

Transfektion von siRNA

Bei der RNA-Interferenz (RNAi), die durch doppelsträngige RNA (dsRNA) hervorgerufen wird, werden Gene post-transkriptionell durch den Abbau von messenger RNA (mRNA) herunterreguliert. Die RNAi ist ein natürlicher und evolutionär hochkonservierter Mechanismus, der in einer Zelle sowohl zur post-transkriptionellen Regulierung zelleigener Gene als auch zum Schutz gegen Viren und Transposons genutzt wird (Haasnoot et al. 2003).

Der Mechanismus (siehe auch Abb. 4.1) kann auch zur gezielten Herunterregulation von Genen genutzt werden, an Säugerzellen wurde dies erstmals im Jahr 2001 mit synthetischen kurzen doppelsträngigen RNA Molekülen (siRNA) gezeigt (Elbashir et al. 2001). Bei einer erzeugten RNAi mittels siRNA muss diese eine Basensequenz aufweisen, die komplementär zur Ziel-mRNA ist. Die heute verwendeten siRNAs sind dabei in der Regel zwischen 20 und 25 Nukleotiden lang. Nach ihrer Transfektion in die Zelle wird die siRNA im „RNA-induced-silencing-complex“ (RISC) gebunden und unter ATP Verbrauch in ihre Einzelstränge aufgetrennt (Nykänen et al. 2001). Einer der beiden Stränge verbleibt im nun aktivierten RISC, wobei nur der komplementäre Strang eine homologe Basenpaarung mit der Ziel-RNA eingehen kann, in deren Folge die mRNA degradiert wird. Wegen des stetigen Abbaus der spezifischen mRNA kann diese nicht mehr translatiert werden und die betreffende Proteinexpression wird unterdrückt.

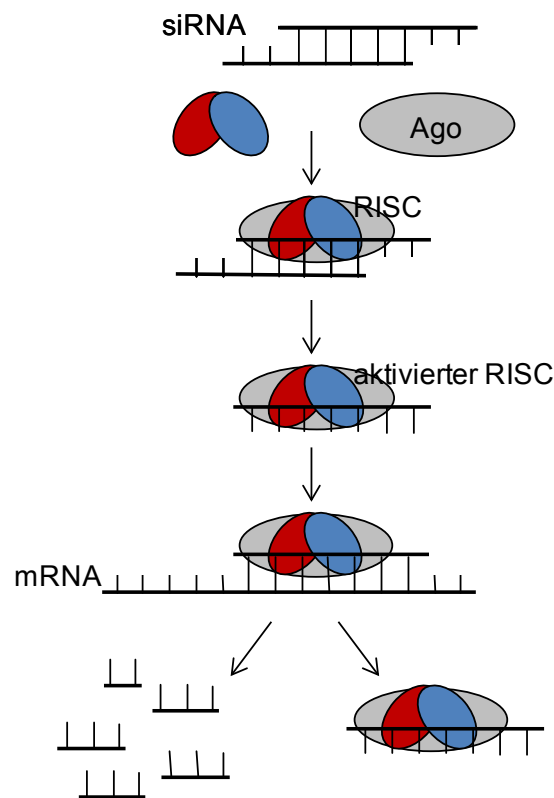


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der RNA-Interferenz (RNAi)

Ist in einer Zelle doppelsträngige RNA wie z. B. siRNA vorhanden, wird dort der Zusammenbau des sog. „RNA-induced-silencing-complex“ (RISC) angeregt. Dieser besteht aus einer Vielzahl von Proteinen, wobei die Proteine der Argonaute Familie (Ago) die Schlüsselkomponente darstellen. Im RISC wird die siRNA in ihre Einzelstränge aufgetrennt und nur einer der beiden Stränge verbleibt im aktivierten Komplex. Bei der Bindung von komplementärer mRNA wird diese im RISC degradiert, der im Anschluss erneut komplementäre mRNA degradieren kann.

Um die Expression bestimmter Gene herunterzuregulieren, wurden FTC 133 wt TSH-R und RO82-W-1 Zellen in dieser Arbeit mit siRNA transfiziert, wozu das Transfektionsreagenz Lipofectamine RNAiMax der Firma Invitrogen verwendet und dem Standardprotokoll gefolgt wurde.

Dazu wurden etwa 6×10^4 Zellen je well auf einer 6-well Platte ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde pro well, dessen Zellen mit siRNA transfiziert werden sollten, 80 pmol siRNA (siehe 4.1.7) in 250 μ l Opti-MEM verdünnt. Außerdem wurden pro well 5 μ l Lipofectamine RNAiMax mit 250 μ l Opti-MEM zusammengeführt und in das Reaktionsgefäß mit der siRNA überführt. Im Fall einer gleichzeitigen Transfektion von zwei verschiedenen siRNAs (Doppeltransfektion) wurden für FTC 133 wt TSH-R Zellen von jeder siRNA 80 pmol eingesetzt und die doppelte Menge an Lipofectamine RNAiMax, jedoch die einfache Menge Opti-MEM verwendet. Für eine Doppeltransfektion der RO82-W-1 Zellen wurden je well insgesamt 80 pmol siRNA angesetzt, also von jeder siRNA 40 pmol, die mit der

einfachen Menge an Lipofectamine RNAiMax zusammengebracht wurde. Es folgte eine Inkubation des siRNA/Lipofectamine RNAiMax-Ansatzes für 10 bis 15 Minuten bei Raumtemperatur. Währenddessen wurden die zu transfizierenden Zellen mit jeweils 2 ml serumfreiem Medium gewaschen. Anschließend wurden je well 2 ml Opti-MEM zugegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden jeweils 490 µl des siRNA/Lipofectamine RNAiMax-Ansatzes tröpfchenweise auf die Zellen in einem well pipettiert. Es folgte eine 4-stündige Inkubation der Zellen im Brutschrank. Anschließend wurde das Opti-MEM mit den Transfektionsreagenzien abgenommen und durch 1,5 ml Zellmedium ersetzt. Die Zellen konnten jetzt für weiterführende Versuche (RNA-Isolierung, Herstellung von Proteinlysaten, XTT-Proliferationstest, Untersuchung der Koloniebildung sowie Boyden-Chamber Migrationstest) verwendet werden.

4.3 Proteinchemische Methoden

4.3.1 Western Blot

Um diverse Proteine in den verschiedenen Zelllinien nachzuweisen, wurde vorrangig das Verfahren des Western Blots angewandt. Dazu wurden Proteinlysate hergestellt, diese dann durch eine diskontinuierliche, denaturierende, SDS-PAGE („Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis“) aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Proteine konnten dann mit Hilfe spezifischer Antikörper über eine Chemilumineszenzreaktion detektiert werden.

4.3.1.1 Generierung von Proteinlysaten

Zur Gewinnung von Proteinlysaten wurden zunächst Zellen angezüchtet und nach Inkubation im Brutschrank durch Zusatz von Detergenzien lysiert. Dazu wurden zwei verschiedene Lysepuffer (Lämmli sowie DTT-haltiger Lysepuffer) verwendet, die beide SDS enthielten. Dieses anionische Detergenz zersetzt Lipidmembranen und bindet und denaturiert Proteine, indem es Wasserstoffbrückenbindungen aufbricht und so Sekundär- und Tertiärstrukturen zerstört. Außerdem maskiert SDS die Eigenladung der Proteine und formt anionische Komplexe. Die beiden Puffer unterschieden sich durch ein Reagenz, das Disulfidbrücken zu freien Thiolen reduzieren sollte. Im Lämmli-Puffer war dies β -Mercaptoethanol, im DTT-haltigen Lysepuffer diente dazu Dithiothreitol (DTT).

Um Proteinlysate herzustellen, wurden bereits transfizierte Zellen verwendet oder 5×10^5 Zellen je well auf einer 6-well Platte ausgesät und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Zellmedium abgenommen und durch

Zellmedium ohne FCS oder zusätzliche Wachstumsfaktoren ersetzt. Nach 24 Stunden weiterer Inkubation im Brutschrank konnten die Zellen mit den verschiedenen Agonisten und/oder Antagonisten behandelt werden. Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Zugabe des Antagonisten immer 30 Minuten vor der des Stimulus. Die anknüpfenden Stimulationszeiten sind im entsprechenden Ergebnisteil angegeben.

Zum Ende der Stimulationszeit wurde das Zellmedium mit den darin enthaltenen Stimuli entfernt und die Zellen in 100-300 µl Lämmli (2x) oder DTT-haltigem Lysepuffer aufgenommen. Mit Hilfe eines Zellschabers wurde das Zelllysats vom Boden der 6-well Platte abgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.3.1.2 SDS-PAGE

Bei einer Elektrophorese wandern geladene Teilchen innerhalb einer Matrix in einem elektrischen Feld. Mit dieser Technik können Gemische von Stoffen oder Teilchen aufgetrennt werden, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit sowohl abhängig von der Größe der Teilchen als auch deren Nettoladung ist. Die SDS-PAGE ist heutzutage die meistverwendete elektrophoretische Methode zur Analyse von Proteinen.

Als Matrix dient in diesem Fall ein Gel, dessen Hauptbestandteil das Polymer Polyacrylamid darstellt. Es entsteht aus Acrylamid-Monomeren, die durch das quervernetzende Reagenz N, N'-Methylenbisacrylamid ein dreidimensionales Netzwerk ausbilden. Die Vernetzung wird durch den Polymerisationsinitiator APS (Ammoniumperoxodisulfat) gestartet und durch TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin) katalysiert. Je höher der Acrylamidanteil des Gels gewählt wird, desto kleiner werden die Poren und desto besser lassen sich kleine Proteine voneinander trennen. Für die Auftrennung großer Proteine ist dagegen ein Gel mit großen Poren und daher geringem Polyacrylamidanteil besser geeignet. Beim Anlegen einer elektrischen Spannung beginnen die negativ geladenen Proteine, sich in Richtung Anode zu bewegen. Dabei können kleine Proteine sich relativ schnell durch die Poren des Gels bewegen, größere Proteine kommen dagegen deutlich langsamer und unter größerem Aufwand voran. Die elektrophoretische Beweglichkeit der SDS-Protein-Komplexe ist weitgehend proportional zum Logarithmus der Molekularmassen, wodurch das charakteristische Proteinbandenmuster entsteht.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE durchgeführt, die bereits im Jahr 1970 etabliert worden ist (Laemmli 1970). Bei dieser Methode werden die Proteine vor ihrer Auftrennung zuerst mit Hilfe eines Sammelgels konzentriert, wodurch die Auflösung im folgenden Trenngel verbessert wird. Die Aufkonzentrierung wird dabei durch einem relativ niedrigen pH Wert von 6,8 erreicht.

Im Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystems liegen die Glycin-Moleküle hauptsächlich ungeladen vor und können daher nicht bzw. nur sehr schlecht den Strom leiten (Folgeionen). Die Chloridionen dagegen besitzen eine sehr hohe Wanderungsgeschwindigkeit (Leitonen). Durch den Mangel an Ladungsträgern entsteht zwischen Leit- und Folgeionen eine hohe elektrische Feldstärke, in der sich die SDS umhüllten Proteine in Richtung Trenngelfront angetrieben werden. Außerdem enthält das Sammelgel eine große Porenweite, Proteine können es so leicht durchlaufen. Im anschließenden Trenngel werden die Proteine auf Grund der engeren Poren verlangsamt. Durch den höheren pH Wert von 8,8 im Trenngel werden die Glycin-Ionen negativ geladen und überholen die Proteine. Dadurch wird der Mangel an Ladungsträgern aufgehoben und die Proteine werden nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Die zur Auftrennung der Proteine verwendeten Gele wurden selbst hergestellt. Dafür wurden Gelkammern der Firma GE Healthcare verwendet und nach Anleitung zusammengesetzt. Für nachzuweisende Proteine, die kleiner als 40 kDa waren, wurden Trenngellösungen mit 12 % Acrylamid gewählt, für größere dagegen solche mit 9 %. Nachdem die Polymerisation mit APS sowie TEMED gestartet worden war, wurde die Lösung sofort zwischen die Glasplatten gegossen (etwa zwei Drittel der Kammerhöhe) und mit 1 ml Isopropanol (100 %) überschichtet. Etwa 15 Minuten später war das Trenngel polymerisiert, das Isopropanol wurde dekantiert und Rückstände durch Waschen mit H₂O (entmineralisiert) entfernt. Anschließend wurde die Sammelgellösung mit APS sowie TEMED versetzt und rasch über das Trenngel geschichtet. Zur Taschenbildung wurde ein zur Apparatur gehöriger Probenkamm in das Sammelgel eingeschoben. Nachdem das Gel mindestens eine Stunde polymerisiert hatte, wurde die Elektrophoresekammer nach Anleitung zusammengebaut und die Taschen mit Proteinlysate beladen. Dazu wurden mit Hilfe einer Hamiltonspritze je nach Versuch 10 bis 30 µl Probe aufgetragen, die zur vollständigen Denaturierung der Proteine zuvor 5 Minuten auf 90 °C erhitzt worden waren. In eine noch unbefüllte Tasche wurden 5 µl Molekulargewichtsmarker eingebracht. Die Elektrophoresekammer wurde nun an eine Spannungsquelle angeschlossen und für etwa 3 Stunden eine Stromstärke von 10 mA je Kammer angelegt. Kurz bevor die Lauffront, die durch das Bromphenolblau sichtbar war, den unteren Gelrand erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet.

4.3.1.3 Elektrotransfer der Proteine auf eine Membran

Ein Elektrotransfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Membran und folgender Immunodetektion wurde nahezu zeitgleich von Towbin et al. sowie Renart et al. im Jahr 1979 erstmals dargestellt (Renart et al. 1979; Towbin et al. 1979). In Anlehnung an den von E. Southern entwickelten Southern-Blot (Southern

1975), bei dem DNA Fragmente aufgetrennt und auf eine Membran übertragen werden, wurden die später entwickelten Übertragungen von RNA bzw. Proteinen auf Membranen fortan als Northern- bzw. Western Blot bezeichnet.

Bei der angewandten Methode wurden die aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel über ein dazu senkrecht gerichtetes elektrisches Feld eluiert und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Es wurde das Mini Trans-Blot® System der Firma BioRad verwendet, mit dem die Proteine im Nassblotverfahren auf die Membran übertragen werden. Dieses Verfahren gilt als proteinschonend, da die Temperatur während des Transfers weitestgehend konstant gehalten wird und der Versuchsaufbau sich nicht übermäßig erwärmt.

Zur Vorbereitung des Proteintransfers wurde das Sammelgel vom Trenngel entfernt. Je Gel wurden eine Nitrozellulosemembran sowie 2 Filterpapiere und 2 Schwämme benötigt, diese wurden in Transferpuffer getränkt. Das Gel wurde luftblasenfrei auf die angefeuchtete Nitrozellulosemembran gelegt und auf jeder Seite ein Filterpapier sowie ein Schwamm aufgelegt. Das Mini Trans-Blot® System wurde nach Anleitung zusammengebaut, mit Transferpuffer befüllt und an eine Spannungsquelle angeschlossen. Für 90 Minuten wurde eine Stromstärke von 180 mA angelegt.

4.3.1.4 Immunfärbung

Nach dem Proteintransfer konnten die immobilisierten Proteine auf der Nitrozellulosemembran mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Dazu wurde das klassische Zwei-Antikörper-Verstärkungssystem angewandt, das durch einen Primär- sowie einen Sekundärantikörper charakterisiert ist. Der Primärantikörper ist dabei selektiv gegen das zu untersuchende Protein gerichtet, während der Sekundärantikörper die schweren, Spezies-spezifischen Ketten (den Fc-Teil des Antikörpers) detektiert und zum Nachweis markiert ist. Die bei der Immunfärbung verwendeten Sekundärantikörper waren an eine Meerrettich-Peroxidase (engl.: „horse radish peroxide“, HRP) gekoppelt.

Um ungesättigte unspezifische Bindungsstellen für Antikörper zu blockieren, wurde die Nitrozellulosemembran eine Stunde lang in Blockierlösung (Roti®-Block) auf einer Wippe bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Blockierlösung entfernt und die Membran kurz mit PBS oder TBS abgespült, bevor der gewünschte Primärantikörper hinzugegeben wurde. Die verwendeten Primärantikörper sowie ihre Verdünnungen sind in Tab. 4.2 aufgeführt. Die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde die Antikörperlösung entfernt und die Nitrozellulosemembran insgesamt 3 Mal für jeweils 10 Minuten mit PBS oder TBS-T gewaschen. In diesen „Waschschritten“ wurden überschüssige

Antikörper, die nicht spezifisch gebunden waren, entfernt. Es folgte eine Inkubation mit dem für den Primärantikörper spezifischen Sekundärantikörper, der 1:5000 in 5 % Milchpulver in PBS oder TBS verdünnt war, für etwa 1,5 Stunden bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde auch der Sekundärantikörper wieder abgenommen und die Nitrozellulosemembran 3 Mal für jeweils 10 Minuten mit PBS-T oder TBS-T sowie ein Mal für 10 Minuten mit PBS oder TBS gewaschen.

Im folgenden Proteinnachweis wurde die enzymatische Aktivität der Meerrettich-Peroxidase ausgenutzt. Wie alle Peroxidasen katalysiert sie in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) die Oxidation von Luminol, wobei Lichtquanten freigesetzt werden. Diese Chemolumineszenz, die vorhandenes Protein nachweist, wurde mit Hilfe des Lumineszenzmessgerätes ChemiSmart 5100 sowie dem zugehörigen Programm ChemiCapt detektiert und dokumentiert. Zur Visualisierung der Proteine wurde jede Membran mit 300 µl ECL-Reagenz (1:1 Gemisch des ECL-Substrats 1 und 2) oder mit 250 µl des sensitiveren Femto Substrats (1:1 Gemisch aus SuperSignal® West Femto Stable Peroxidase Solution und SuperSignal® West Femto Luminol/Enhancer Solution, Thermo) bedeckt. Danach wurde sie zwischen zwei lichtdurchlässige Folien geschichtet und in das Lumineszenzmessgerät gelegt. Je nach Stärke der Lumineszenz wurde die Länge der Aufnahmezeit verschieden gewählt. Das nachzuweisende Protein wurde anschließend als abgegrenzte „Bande“ sichtbar. Je heller diese Bande war, desto mehr Protein war vorhanden. Da es jedoch üblich ist, diese „Banden“ in Graustufen darzustellen, sind im Ergebnisteil die Negative der Aufnahmen abgebildet.

Tab. 4.2: Verwendete Primärantikörper sowie ihre Verdünnungen beim Western Blot

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Angesetzt in...
Anti-c-Fos	Kaninchen	1:1000	5 % Milchpulver in PBS
Anti-Cox-2	Kaninchen	1:1000	5 % BSA in TBS-T
Anti-ERK 2	Kaninchen	1:1000	5 % Milchpulver in PBS
Anti-NFATc1	Kaninchen	1:200	5 % BSA in TBS-T
Anti-NFATc2	Maus	1:500	5 % BSA in TBS-T
Anti-NFATc3	Maus	1:200	5 % BSA in TBS-T
Anti-p-ERK	Maus	1:500	5 % Milchpulver in PBS
Anti-RCAN1	Kaninchen	1:1000	5 % BSA in TBS-T

Um auszuschließen, dass verschiedene Proteinmengen durch die Auftragung von verschieden aufgetragenen Gesamtproteinmengen bedingt waren, musste im Anschluss eine Ladekontrolle durchgeführt werden. Hierbei ist der verwendete Primärantikörper gegen ein sogenanntes "Haushaltsgen" gerichtet, das in der Zelle unabhängig von

äußeren Einflüssen exprimiert wird. Für die Ladekontrolle wurden zuerst die noch gebundenen Antikörper von der Nitrozellulosemembran abgelöst, indem diese über Nacht in 40 ml Ablösepuffer gelegt und bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Am nächsten Tag wurde der Puffer entfernt und die Nitrozellulosemembran insgesamt 3 Mal mit PBS-T sowie einmal mit PBS für jeweils 10 Minuten gewaschen. Von da an wurde genauso verfahren wie nach dem Elektrottransfer der Proteine auf die Membran. Für die Ladekontrolle wurde der Anti-ERK 2 Primärantikörper verwendet.

4.3.2 Immunzytochemische Analysen

Neben dem Verfahren des Western Blots ist die Immunzytochemie (ICC) eine gängige Technik, bei der Proteine mittels spezifischer Antikörper analysiert werden können. Hier erfolgt der Nachweis jedoch in der Zelle und die Auswertung findet am Mikroskop statt. Beim Nachweis eines Proteins kann so (bei ausreichender Auflösung des Mikroskops) auch dessen subzelluläre Lokalisation ermittelt werden.

In dieser Arbeit sollten NFAT Proteine vor und nach einer Stimulation mit TSH oder Ionomycin immunzytochemisch untersucht werden. Dabei sollte die Lokalisation der Proteine ermittelt werden, da aktivierte NFAT Proteine vom Zytoplasma in den Zellkern translozieren. Nach der Fixierung der Zellen erfolgte der Nachweis durch indirekte Immunfluoreszenz. Die verwendeten Sekundärantikörper waren mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, daher erfolgte die Auswertung an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop. Zusätzlich zu den Antikörpern wurde das rot fluoreszierende Carbocyanin Monomer TO-PRO-3 zugegeben, das den Zellkern selektiv anfärbt (Van Hooijdonk et al. 1994; Bink et al. 2001).

Zwei Tage vor Beginn des Versuches wurde in eine 6-well Platte je well ein steriles Deckgläschen mit einem Durchmesser von 24 mm gelegt und mit Poly-L-Lysin beschichtet. Anschließend wurden auf dieser Platte je well etwa 4×10^4 FTC 133 wt TSH-R Zellen ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Zellmedium abgenommen und durch Zellmedium ohne FCS oder zusätzliche Wachstumsfaktoren ersetzt. Erneut wurden die Zellen über Nacht im Brutschrank inkubiert, bevor sie am nächsten Tag für verschiedene Zeiträume mit TSH, Ionomycin oder FCS stimuliert wurden. Nachdem die jeweilige Stimulationszeit beendet war, wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal kurz mit jeweils 1,5 ml PBS gewaschen. Danach wurden sie in 1,5 ml eiskaltem Methanol (100 %) für 2 Minuten bei Raumtemperatur fixiert, das Methanol wieder abgenommen und durch 5 minütiges Waschen mit 1,5 ml PBS vollständig entfernt. Zum Abblocken von unspezifischen Bindungsstellen wurden 200 µl einer 1 % BSA/0,3 % Triton X-100/PBS Lösung vorsichtig auf die Zellen pipettiert und der für 30 Minuten bei Raumtemperatur

in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Blockierlösung wurde entfernt und durch 150 µl der Primärantikörperlösung ersetzt. Die verwendeten Primärantikörper sowie ihre Verdünnungen sind in Tab. 4.3 aufgeführt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden die Zellen 3 Mal für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 1,5 ml PBS gewaschen, um überschüssige, nicht spezifisch gebundene Antikörper zu entfernen und dann mit 150 µl Sekundärantikörperlösung bedeckt. Diese enthielt den fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper im Verhältnis 1:500 sowie den DNA-Fluoreszenzfarbstoff TO-PRO-3 im Verhältnis 1:1000 in einer 1 % BSA/0,3 % Triton X-100/PBS Lösung. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Danach wurden die Zellen im Dunkeln 3 Mal für 10 Minuten mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen und im Anschluss eingedeckt. Dafür wurde je Deckgläschen ein Tropfen Fluoreszenz-Eindeckmedium auf einen Objektträger gegeben, das Deckgläschen mit der Zellseite nach unten auf diesen Tropfen gelegt und festgedrückt. Der Objektträger wurde zum Trocknen des Eindeckmediums 45 Minuten im Dunkeln gelagert und schließlich die Deckgläschen mit farblosem Nagellack umrandet, damit die Proben nicht austrockneten.

Der Proteinnachweis am konfokalen Mikroskop fand mit freundlicher Hilfe und fachkundiger Unterstützung von Heike Borth statt.

Tab. 4.3: Verwendete Primärantikörper sowie ihre Verdünnungen bei immuncytochemischen Analysen

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Angesetzt in...
Anti-NFATc1	Kaninchen	1:25	1 % BSA/0,3 % Triton X-100/PBS
Anti-NFATc2	Maus	1:25	1 % BSA/0,3 % Triton X-100/PBS
Anti-NFATc3	Maus	1:25	1 % BSA/0,3 % Triton X-100/PBS

4.4 Molekularbiologische Methoden

4.4.1 RNA-Isolierung aus Zelllysaten

Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden sollte die Genexpression auf mRNA-Ebene untersucht werden. Bei der Isolierung der RNA muss besonders sorgfältig gearbeitet werden, da die fast ubiquitär vorkommenden RNasen die Hydrolyse von Ribonukleinsäuren in kleinere Fragmente katalysieren. Daher wurde hier ausschließlich mit Handschuhen und – wenn möglich – auf Eis gearbeitet. Das für bestimmte Schritte

der Isolierung notwendige H₂O wurde zunächst über Nacht 1:1000 mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt, einem reaktiven Molekül, das RNasen sowie andere Enzyme durch kovalente Modifikation an Histidinresten unspezifisch inaktiviert. Durch Autoklavieren wurde das DEPC anschließend in einer Reaktion mit H₂O zu CO₂ und Ethanol gespalten (Hydrolyse).

Für die RNA-Isolierung wurde die Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode verwendet, die 1987 von der Arbeitsgruppe Chomczynski et al. etabliert wurde (Chomczynski et al. 1987). Bei dieser Methode wird mit einem Reagenz gearbeitet, das sowohl Guanidinisothiocyanat (GITC) als auch Phenol in einer echten Lösung enthält. Das chaotrope Salz GITC lysiert dabei die Zellen und inhibiert RNasen, indem es Proteine denaturiert. Das saure Phenol senkt den pH-Wert, wodurch sich Proteine und DNA im Reagenz lösen. Durch Zugabe von Chloroform wird eine Phasentrennung in eine wässrige (oben) und eine organische Phase (unten) herbeigeführt. Nach vorsichtigem Ausschütteln ist der Hauptteil der Proteine in der unteren, rötlichen Phenol-Chloroform-Phase gelöst, die von der oberen, farblosen Phase durch eine weiße Interphase getrennt ist. Diese Interphase enthält DNA; die zu isolierende RNA befindet sich dagegen in der oberen Phase. Diese obere Phase wird vorsichtig abpipettiert und die darin enthaltene RNA durch die Zugabe von Isopropanol gefällt. Nach Entfernen des Isopropanol-haltigen Überstands wird das RNA-Sediment getrocknet und anschließend in H₂O resuspendiert.

Für eine RNA Isolierung wurden bereits transfizierte Zellen verwendet oder 5 x 10⁵ Zellen je well auf einer 6-well Platte ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Zellmedium abgenommen und durch Zellmedium ohne FCS oder zusätzliche Wachstumsfaktoren ersetzt. Nach 24 Stunden weiterer Inkubation im Brutschrank konnten die Zellen mit den verschiedenen Agonisten und oder Antagonisten behandelt werden. Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Zugabe des Antagonisten immer 30 Minuten vor der des Stimulus. Die jeweiligen Stimulationszeiten sind im entsprechenden Ergebnisteil angegeben.

Nach Ende der Stimulationszeit wurde das Zellmedium entfernt, die Zellen in 1 ml TriReagent[®] der Firma Sigma Aldrich auf Eis lysiert und dem Standardprotokoll gefolgt. Der lysierte Zellrasen wurde mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der wells gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Der Suspension wurden 200 µl Chloroform zugesetzt, der Ansatz gut gemischt (verwirbelt) und 15 Minuten bei 3000 x g und 4 °C zentrifugiert. Von den drei Phasen wurden etwa 500 µl der oberen, wässrigen Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 500 µl eiskaltem Isopropanol und anschließendem Invertieren wurden die gelöste RNA gefällt. Es folgte ein 20 minütige Zentrifugation bei 18.000 x g und 4 °C, anschließend wurde

der Überstand abdekantiert und zurück blieb ein durchsichtiges Pellet, das die RNA enthielt. Dieses wurde zweimal mit jeweils 1 ml 75 % eiskaltem Ethanol und anschließender 5 minütiger Zentrifugation bei 18.000 x g und 4 °C gewaschen. Nach einem Trocknen bei Raumtemperatur wurde die RNA je nach Größe in 10 bis 25 µl H₂O aufgenommen. Die wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

Bevor die RNA für folgende Versuche verwendet werden konnte, wurde sowohl ihre Konzentration als auch die Reinheit im Photometer mit Hilfe des Nanodrops gemessen. Dafür wurde die Extinktion bei 260 nm (OD₂₆₀), dem Absorptionsmaximum von RNA und DNA, und 280 nm (OD₂₈₀), dem Absorptionsmaximum von Proteinen, gegen den Leerwert bestimmt.

Da die Konzentration von 40 µg/ml RNA einer OD₂₆₀ von 1 entspricht, kann die Konzentration der RNA durch die folgende Formel einfach berechnet werden:

$$\text{RNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} * 40 \mu\text{g/ml}$$

Die Reinheit der RNA wird anhand des Quotienten aus OD₂₆₀ und OD₂₈₀ überprüft. Im Idealfall sollte dieser zwischen 1,8 und 2,0 liegen, ein niedrigerer Wert deutet auf eine Kontamination mit Proteinen hin, ein höherer Wert lässt hingegen auf eine Kontamination mit DNA oder auch aromatischen Substanzen schließen. RNA Proben, deren Ratio vom optimalen Bereich abwich, wurden verworfen.

4.4.2 cDNA-Synthese

Zur Analyse der Genexpression mittels Polymerase-Kettenreaktion (engl.: „polymerase chain reaction“, PCR) muss die isolierte RNA zuerst in sog. „copy DNA“ (cDNA) umgeschrieben werden. Dies erfolgt mit Hilfe einer reversen Transkriptase; einem viralen Enzym, das virale RNA zu DNA synthetisiert. Das Enzym benötigt zur Initiation der Synthese einen kurzen doppelsträngigen RNA Abschnitt, der durch Zugabe eines kurzen einzelsträngigen Oligonukleotids mit einer zur RNA komplementären Basensequenz (Primer) erzeugt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine reverse Transkriptase des *Moloney-murine-leukemia-Virus* (RevertAid™ H Minus M-MuLV RT; 200 U/µl) sowie ein Oligo(dT)₁₈ Primer verwendet. Dieser ist komplementär zum Poly(A)-Schwanz am 3' Ende von mRNA, wodurch nicht die gesamte RNA, sondern nur mRNA zu cDNA umgeschrieben wird.

Für die cDNA-Synthese wurde dem Standardprotokoll des „RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit“ der Firma Thermo Fisher Scientific gefolgt. Zuerst wurden 2 µg Gesamt-RNA mit DEPC-H₂O auf 11 µl aufgefüllt und mit 1 µl Oligo(dT)₁₈

Primer in einem 100 µl Reaktionsgefäß vermischt. Der Ansatz wurde 5 Minuten bei 70 °C inkubiert und das Reaktionsgefäß dann auf Eis abgekühlt. Danach wurden 4 µl 5-fach konzentrierter Reaktionspuffer sowie 2 µl dNTP-Mix und 1 µl Ribonuklease-inhibitor im Mastermix dazugegeben. Bei Raumtemperatur wurde für 5 Minuten inkubiert, anschließend 200 Einheiten (entspricht 1 µl) reverse Transkriptase hinzugefügt und jede Probe durchmischt. Die Proben wurden in einen Thermocycler gestellt und zuerst 10 Minuten bei 25 °C inkubiert, in dieser Zeit sollten sich die Primer an die RNA anlagern. Es folgte eine 60 minütige Inkubation bei 42 °C, dem Temperatur-Optimum der reversen Transkriptase, während der die Synthese der RNA stattfand. Die Reaktion wurde durch die Denaturierung des Enzyms gestoppt, indem der Ansatz für 10 Minuten auf 70 °C erwärmt wurde. Die erhaltene cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

4.4.3 Quantitative PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Technik zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente und wurde in den 1980er Jahren von Mullis et al. entwickelt (Mullis et al. 1987). Werden diese amplifizierte Nukleinsäureabschnitte zusätzlich quantifiziert, wird die Methode als quantitative PCR (qPCR) bezeichnet (Higuchi et al. 1992; Valasek et al. 2005). Das Funktionsprinzip jeder PCR beruht dabei auf der Fähigkeit von DNA-Polymerasen, beim Vorliegen eines kurzen, doppelsträngigen DNA-Abschnitts einen Einzelstrang zum Doppelstrang ergänzen zu können.

Für eine PCR benötigt man demnach eine Polymerase, Desoxynukleosidtriphosphate, die ihr als Substrat dienen, sowie einen Vorlagestrang (Template), im vorliegenden Fall die umgeschriebene cDNA. Außerdem sind zur Erzeugung des Doppelstrangs sequenzspezifische einzelsträngige Oligonukleotide nötig, die als Primer bezeichnet werden. Ihre Sequenz muss komplementär zur Sequenz der Ziel-DNA sein, da die Primer Startpunkt der Synthese sind und so den zu vervielfältigenden Bereich flankieren. Die Reaktion muss im geeigneten Reaktionspuffer stattfinden. Bei der durchgeführten qPCR wurde zusätzlich noch der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green verwendet, der sich in die kleinen Furchen doppelsträngiger DNA einlagert. Nur in dieser Konformation fluoresziert er, wenn er mit Licht mit einer Wellenlänge von 494 nm angeregt wird. Diese Fluoreszenz ist proportional zur Menge an doppelsträngiger DNA und damit auch zur Menge an gebildetem PCR Produkt.

Eine qPCR Reaktion besteht aus 3 aufeinander folgenden Phasen, die zusammengenommen als ein Zyklus bezeichnet werden und mehrmals wiederholt werden.

1. **Denaturierung:** Bei 95 °C wird die DNA in ihre Einzelstränge zerlegt, indem die Wasserstoffbrückenbindungen der doppelsträngigen DNA „aufgebrochen“ werden. Im ersten Zyklus der PCR wird die DNA für 15 Minuten erhitzt (Initialisierung), da sichergestellt werden soll, dass sich sowohl Ausgangs-DNA als auch die Primer vollständig voneinander getrennt haben. Außerdem muss die verwendete sog. „hot start“ DNA-Polymerase durch diesen Vorgang aktiviert werden.
2. **Anlagerung der Oligonukleotide („Annealing“):** Bei 55 °C lagern sich die spezifisch ausgewählten Primer an die einzelsträngige DNA an. Durch die Primer wird die Annealing-Temperatur festgelegt, sie ist abhängig von der Länge des Primers sowie seinem G/C Gehalt bzw. dem der korrespondierenden DNA-Sequenz. Bei der Auswahl eines Primerpaares ist es daher wichtig, dass diese eine ähnliche Schmelztemperatur besitzen.
3. **Elongation:** Bei 72 °C wird von der DNA-Polymerase, ausgehend vom Primer, ein neuer DNA-Einzelstrang komplementär zum Vorlagestrang synthetisiert, so dass wieder doppelsträngige DNA vorliegt.
Am Ende der Elongationsphase wird die Fluoreszenz des interkalierenden Farbstoffs SYBR Green (s. o.) bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurden 55 Amplifikationszyklen durchgeführt, wobei für jede Phase eine Länge von 10 Sekunden gewählt wurde. Die qPCR Reaktion erfolgte in einem Real-Time-PCR-Gerät (LightCycler® 450 II, Roche, Mannheim), das Proben präzise auf die jeweiligen Temperaturen erhitzt bzw. kühlt und zusätzlich die Fluoreszenzstärke ermittelt.

Da nicht alle Proben exakt die gleiche Ausgangskonzentration an cDNA aufweisen, wurde eine relative Quantifizierung vorgenommen. Dabei erfolgt die Aussage über die Expressionsstärke eines beliebigen Gens im Bezug auf ein stabil exprimiertes Gen (sog. "Haushaltsgen"), hier β -Aktin. Dieses wird in Schilddrüsenzellen auch nach Stimulationen z. B. mit Progesteron oder Estradiol stabil exprimiert, während andere Haushaltsgene (β 2-Mikroglobulin (B2M), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und TATA-Box Bindeprotein (TBP)) hier größere Schwankungen aufweisen (Santin et al. 2013). Von jeder cDNA Probe, die auf die Genexpression eines spezifischen Gens getestet werden sollte, wurde also parallel ein Ansatz derselben cDNA mit einem β -Aktin-Primer angefertigt. Zusätzlich wurden Proben ohne cDNA („Wasserproben“) angesetzt, um eventuelle DNA-Kontaminationen in den verwendeten Reaktionslösungen identifizierbar zu machen.

Für die Quantifizierung wurde von jeder Probe ein sog. „Crossing Point“ (CP) benötigt, jener Punkt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Dieser wurde mit Hilfe des Computerprogramms LightCycler® Software 4.05 ermittelt. Die erhaltenen Werte wurden mit Hilfe von Microsoft Excel über die folgende Rechenoperation ausgewertet. Dabei wurde vom Idealfall ausgegangen, in dem DNA bei jedem Zyklus verdoppelt wird:

$$\text{Menge des Amplifikats (\% von } \beta \text{ Aktin)} = \frac{2^{\text{CP(Aktin)}}}{2^{\text{CP(Amplifikat)}}} * 100$$

Im Anschluss an die qPCR Reaktion wurde zusätzlich eine Schmelzkurvenanalyse vorgenommen, mit dem die Spezifität des jeweiligen Amplifikats bestimmt werden kann. Hier wird die DNA nach der letzten Elongationsphase schrittweise erhitzt (4,4 °C je Sekunde) und so in ihre Einzelstränge zerlegt. Dabei wird die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen und dadurch die Aufspaltung des Doppelstrangs durch die Abnahme der Fluoreszenz dokumentiert. Anhand der negativen ersten Ableitung der Fluoreszenzintensität gegen die Temperatur (sog. Schmelzkurve) kann der Schmelzpunkt des PCR Produktes leicht in Form eines Peaks abgelesen werden. Da dieser sowohl vom G/C Gehalt als auch der Länge des Amplifikats abhängig ist, kann so die Spezifität des PCR Produkts überprüft werden. Sind nur unspezifische Primer-dimere entstanden, wird dies durch eine deutlich niedrigere Schmelztemperatur erkennbar. Bei zwei oder mehr Peaks war die Amplifikation nicht nur für ein einziges DNA-Ziel spezifisch: die Probe war offenbar verunreinigt worden und der Ansatz wurde verworfen.

Für die qPCR Reaktion wurde *LightCycler® 480 SYBR Green I Master* der Firma Roche oder *Absolute SYBR Capillary Mix* der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet und dem Standardprotokoll gefolgt. Dafür wurden 10 µL des SYBR Greens (2x), 8 µL cDNA (1:100 in Nuklease-freiem H₂O verdünnt) und jeweils 1 µl komplementärer sowie nicht komplementärer Primer (10 pmol/µl) auf einer dafür vorgesehenen 96-well Platte vereint und diese mit spezieller Folie verschlossen. Um sicher zu stellen, dass sich die Flüssigkeiten am Boden des Gefäßes befanden, wurde die Platte 3 Minuten bei 1300 x g zentrifugiert und anschließend zum Start des Amplifizierungsprotokolls in das Real-Time-PCR-Gerät gestellt.

4.5 Spezielle Messmethoden und Versuche

4.5.1 Bestimmung der intrazellulären Calciumionenkonzentration einer Zellpopulation mittels Fura-2/AM

Fura-2 ist ein fluoreszierender Calciumchelator, der bei der Bindung von Calciumionen seine Fluoreszenzeigenschaften verändert. Während das Emissionsspektrum des Farbstoffs mit einem Maximum bei 510 nm nahezu unverändert bleibt, liegt das Exzitationsmaximum von an Calciumionen gebundenem Fura-2 bei 340 nm, bei dieser Wellenlänge ist die Fluoreszenzintensität von freiem Fura-2 nur sehr gering. Bei 380 nm ist die Intensität dagegen am größten, wenn Fura-2 nicht an Calciumionen gebunden ist. Einzig bei einer Exzitation mit 360 nm ist die Emission des Farbstoffs Calciumionen-unabhängig (Abb. 4.2), diese Wellenlänge wird als isosbestischer Punkt bezeichnet (Grynkiewicz et al. 1985).

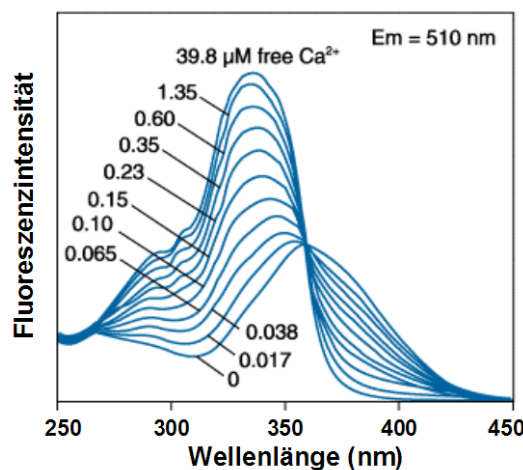


Abb. 4.2: Fluoreszenzintensität von Fura-2

Dargestellt sind ist die Fluoreszenzintensität von Fura-2 in Abhängigkeit von der Exzitationswellenlänge bei verschiedenen Calciumionenkonzentrationen von 0 bis 39,8 μM . Bei der Exzitation mit 360 nm ist die Emission des Farbstoffs Calciumionen-unabhängig (isosbestischer Punkt). Die Emissionswellenlänge hat ihr Maximum bei 510 nm und bleibt bei den verschiedenen Calciumionenkonzentrationen nahezu unverändert. Die Abbildung wurde modifiziert nach Grynkiewicz et al. (Grynkiewicz et al. 1985).

Mit Hilfe von Fura-2 kann die intrazelluläre Calciumionenkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) von Zellen *in vitro* bestimmt werden. Dazu werden diese mit dem lipophilen Ester des Farbstoffs (Fura-2 acetoxymethylester; Fura-2/AM) inkubiert, der leicht über die Zellmembran ins Innere der Zelle diffundieren kann. Dort wird Fura-2/AM durch Esterasen zu Fura-2 gespalten und dadurch polar, eine Rückdiffusion in den Extrazellulärraum wird so verhindert. Bei der anschließenden Fluoreszenz-Messung einer Zellsuspension im Mikrotiterplatten-Lesegerät FLUOstar (BMG Labtech) wurden fast simultan die Emissionen bei der Anregung mit 340 und 380 nm gemessen

(Abb. 4.3 A). Die hohe Zeitauflösung ist Voraussetzung für die Messung, denn der Quotient dieser Fluoreszenz gilt als Maß für die absolute $[Ca^{2+}]_i$ (Abb. 4.3 B) und ist innerhalb des dynamischen Messbereichs unabhängig von der Beladungseffizienz der Zelle mit Fura-2.

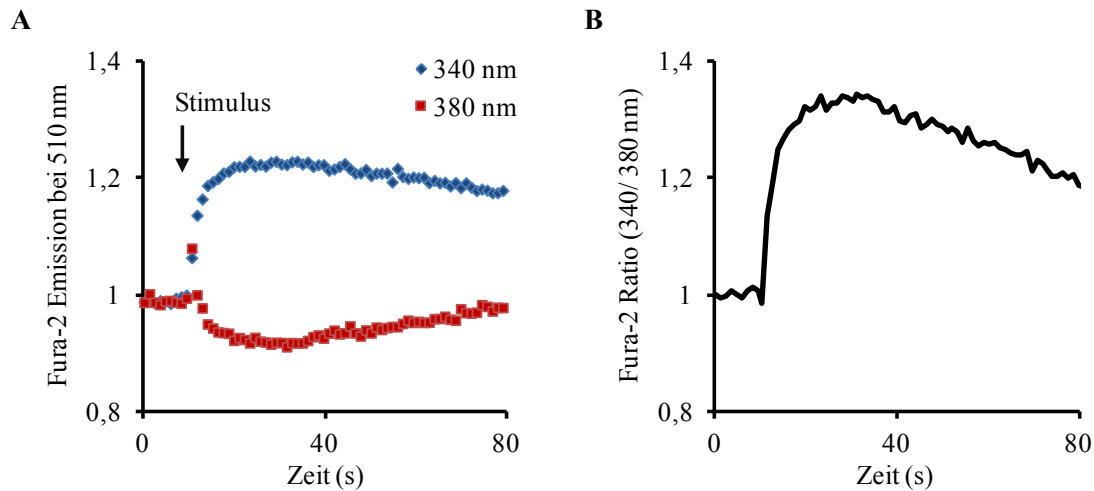


Abb. 4.3: Exemplarische Graphen einer Fura-2 Messung

(A) Nach Injektion eines Calciumionen-freisetzenden Stimulus (Pfeil) nimmt die Fura-2 Emission bei 510 nm nach der Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 340 nm zu (blau), während sie nach der Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 380 nm abnimmt (rot). (B) Dargestellt ist der Quotient der Emission der beiden Wellenlängen gegen die Zeit aus A.

Für die Bestimmung der $[Ca^{2+}]_i$ wurden FTC 133 wt TSH-R, HTC 238, ML-1 sowie RO82-W-1 Zellen mit TSH stimuliert und gleichzeitig gemessen. Außerdem wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen vor ihrer TSH-Behandlung für 30 Minuten mit Thapsigargin vorinkubiert, um intrazelluläre Calciumionenspeicher zu leeren, und anstelle von TSH auch mit ATP, Bradykinin, Carbachol oder Somatostatin stimuliert.

Zur Vorbereitung der Messung wurde aus einer mindestens 50 % konfluenten Kulturflasche das Kulturmedium abgenommen, die Zellen mit 4 ml EGTA-Lösung (2 mM) bedeckt und 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. EGTA ist ein potenter Calciumionenchelator und wird zur Ablösung der Zellen vom Flaschenboden genutzt, da die Verwendung von EGTA für die Zellen deutlich schonender ist als die von Trypsin. So führt EGTA, im Gegensatz zu Trypsin, nicht zu einem Verdau der Zellmembran und einer dadurch bedingten Bildung von Poren, durch die extrazelluläre Calciumionen unspezifisch in die Zelle eintreten könnten. Durch leichtes „Klopfen“ wurden die Zellen nach der Inkubationszeit vollständig von der Unterlage gelöst und nach der Zugabe von 10 ml HBS⁺⁺⁺ 6 Minuten bei 100 x g zentrifugiert. Der Zellüberstand wurde abgenommen und die Zellzahl auf 200.000 je Milliliter eingestellt. Für die Beladung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2/AM wurden 1.000.000 Zellen (5 ml

Zellsuspension) in ein 15 ml Röhrchen überführt, 5 µl Fura-2/AM (5 mM in DMSO) hinzugegeben und durch Invertieren verteilt. Die Zellen wurden zur Aufnahme des Farbstoffs für 15 Minuten im Brutschrank inkubiert und anschließend 6 Minuten bei 100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und durch 5 ml HBS⁺⁺⁺ ersetzt.

Soweit die Zellen nicht vor der Messung noch mit Thapsigargin behandelt werden sollten, wurden jeweils 100 µl Zellsuspension pro well in eine 96-well Mikrotiterplatte mit Glasboden für die Messung ausgesät. Die anschließende Fluoreszenzmessung wurde in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (FLUOstar) durchgeführt. Das Gerät wurde so eingestellt, dass es nach 10 Sekunden automatisch 20 µl des jeweiligen Stimulus (in 6-facher Konzentration) bzw. HBS⁺⁺⁺ (zur Kontrolle) injizierte.

Sollten die Zellen vor ihrer Stimulation noch mit Thapsigargin behandelt werden, wurden die Zellen nach der Aufnahme in 5 ml HBS⁺⁺⁺ mit 1 µl Thapsigargin versetzt. Es folgte eine 30 minütige Inkubation im Brutschrank, bevor die Zellen zur Messung in die 96-well Mikrotiterplatte ausgesät wurden.

Messung unter Calciumionen-freien Bedingungen

Die Bestimmung der intrazellulären Calciumionenkonzentration wurde außerdem unter Calciumionen-freien Bedingungen im Extrazellulärraum ausgeführt. Durch Chelatierung der extrazellulären Calciumionen sollte herausgefunden werden, ob ein möglicher Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration nach Behandlung mit TSH auf die Freisetzung von Calciumionen aus internen Speichern zurückzuführen ist.

Die Beladung der Zellen mit Fura-2/AM erfolgte nach dem oben beschriebenen Protokoll in HBS⁺⁺⁺. Nachdem die Zellen beladen und erneut zentrifugiert worden waren, wurde die HBS/Fura-2/AM-Lösung entfernt. Die Zellen wurden in 5 ml HBS aufgenommen, das zur Calciumionen-Chelatierung 1 mM EGTA sowie 0,1 % Glucose und 0,1 % BSA enthielt (HBS^{-Ca²⁺}). Die Aussaat und Messung der Zellen erfolgte ebenfalls wie im oben beschriebenen Protokoll, außer dass zur Injektion ausschließlich HBS^{-Ca²⁺} anstatt HBS⁺⁺⁺ verwendet wurde.

4.5.2 Bestimmung des Calciumioneneinstroms in Einzelzellen mittels Fura-2/AM (Mangan-„Quench“)

Eine genauere Charakterisierung der Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ kann mit Hilfe eines sog. Mangan-„Quench“ Experiments vorgenommen werden. Hier können Calciumionen, die aus dem Extrazellulärraum einströmen, funktionell von solchen getrennt

werden, welche die $[Ca^{2+}]_i$ durch ein Ausströmen aus dem endoplasmatischen Retikulum erhöhen. In diesem Experiment wird ausgenutzt, dass die meisten Calciumionenkanäle in der Plasmamembran nicht selektiv sind, sondern auch andere zweiwertige Ionen wie Mangan- oder Strontiumionen permeieren lassen. Außerdem spielen die Fluoreszenzeigenschaften von Fura-2 eine wichtige Rolle, da dessen Fluoreszenz am isosbestischen Punkt (360 nm) unabhängig von Calciumionen durch Manganionen vermindert wird. Dieser Vorgang wird als „Quenching“ bezeichnet. Die Abnahme eines Fura-2 abhängigen Fluoreszenzsignals bei 360 nm in Manganionenhaltigem Puffer steht daher (bei Berücksichtigung eines Ausbleichens des Fluoreszenzfarbstoffes) in direkter Korrelation zum Calciumioneneinstrom aus dem Extrazellulärraum.

Bei dem Mangan-„Quench“ sollte überprüft werden, ob eine mögliche TSH-abhängige Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in FTC 133 wt TSH-R Zellen ausschließlich auf einen Calciumionenausstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum zurückzuführen ist, oder ob zusätzlich Calciumionen aus dem Extrazellulärraum einströmen.

Dafür wurden 5×10^5 Zellen je Deckgläschen (Durchmesser 24 mm) in einer 6-well Platte ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Zellmedium abgenommen und durch 1,5 ml HBS^{+++} ersetzt. Es folgte die Beladung mit Fura-2/AM. Hierfür wurden in jedes well 1,5 μ l Fura-2/AM (5 mM) pipettiert und die Platte kurz geschwenkt. Die Zellen wurden für 15 Minuten im Brutschrank inkubiert, dann wurde das HBS^{+++} mit dem Farbstoff abgenommen und durch 1,5 ml frisches HBS^{+++} ersetzt. Zur Durchführung der Messung wurde ein Deckgläschen aus der 6-well Platte entnommen, in die Mitte einer Messkammer eingesetzt und mit 500 μ l HBS^{+++} überschichtet. Unter einem 20er Ölimmersionsobjektiv wurde ein geeignetes Blickfeld ausgewählt und mit Hilfe des Computerprogramms Tillvision® die zu messenden Zellen markiert. Das Experiment wurde gestartet, dazu wurde mit Hilfe des Calcium-Imaging-Systems alle 0,5 Sekunden die Fluoreszenzintensität bei einer Exzitationswellenlänge von 360 nm am bestimmt. Nach etwa 150 Messzeitpunkten erfolgte die Zugabe von 500 μ l $MnCl_2/HBS^{+++}$ Lösung zu einer finalen $MnCl_2$ -Konzentration von 1 mM $MnCl_2$ und gleichzeitig die Stimulation mit TSH in einer finalen Konzentration von 50 mU/ml. Die Messung wurde insgesamt 1000 Messzeitpunkte nach ihrem Start (entspricht etwa 500 Sekunden) abgeschlossen. Zur Auswertung der Messung wurde die Fluoreszenz bei 360 nm, die dem Mn^{2+} -Einstrom in die Zelle entspricht, gegen die Zeit aufgetragen und basale mit TSH-stimulierten Bedingungen verglichen. Zur Quantifizierung wurde die Summe der Messwerte nach der Stimulation abzüglich des mittleren Ausgangswertes berechnet.

Im Fall einer Behandlung mit Inhibitoren erfolgte die Zugabe von 10 μ M SKF-96365 nach Abschluss der Beladung mit Fura-2. Die Zellen wurden dann vor ihrer Messung noch 30 Minuten mit dem Inhibitor im Brutschrank inkubiert, anschließend aber genauso vermessen wie oben beschrieben. Sowohl bei der Überschichtung in der Perfusionskammer mit HBS⁺⁺⁺ als auch bei der späteren Zugabe von μ l 2 mM MnCl₂/HBS⁺⁺⁺ Lösung war zusätzlich Inhibitor in den Puffer enthalten.

4.5.3 NFAT-Reportergenstudie

Reportergene werden in der Molekularbiologie häufig eingesetzt, um die transkriptionelle Aktivität bestimmter Gene in Zellen zu untersuchen. Dazu wird üblicherweise ein Reportergen hinter eine gewünschte Promotersequenz (die des zu untersuchenden Gens) in einen Expressionsvektor kloniert und dieser in Zellen transfiziert. Die Anforderung an das Reportergen ist dabei, dass es leicht und reproduzierbar nachzuweisen sein muss und nicht endogen in der Zelle vorkommen darf.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Reportergen benutzt, um die Aktivität des Transkriptionsfaktors NFAT zu untersuchen. Dazu wurde der pGL4.30[luc2P/NFAT-RE/Hygro] Vektor der Firma Promega verwendet, der ein sog. NFAT-Response-Element enthält. Dieses Response-Element dient als Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor NFAT und ist Teil des Promoters von NFAT-abhängigen Zielgenen. Nur durch Dephosphorylierung aktiviertes NFAT transloziert in den Zellkern, bindet dort an das Response-Element und initiiert dadurch die Transkription. Wird das Reportergen nachgewiesen, ist das darauf zurückzuführen, dass aktives NFAT in der Zelle vorhanden ist.

Als Reportergen wurde die Luciferase der amerikanischen Feuerfliege (*Photinus pyralis*) verwendet, die auch als Firefly-Luciferase bezeichnet wird. Erstmals im Jahr 1985 kloniert (de Wet et al. 1985), ist ihr Einsatz heutzutage in Reportergenstudien weit verbreitet. Das Enzym katalysiert die Reaktion von Luciferin in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff, ATP und Magnesiumionen zu Oxyluciferin, wobei die frei werdende Energie über ein optisch angeregtes Oxidationsprodukt in Form von Photonen abgegeben wird (siehe Abb. 4.4). Um dieses Lumineszenz-Signal stabiler zu machen und um eine höhere Lumineszenz zu erreichen, ist dem verwendeten Luciferasesubstrat der Firma Promega laut Herstellerangaben zusätzlich zu Luciferin noch Coenzym A zugesetzt. Der Mechanismus hierzu ist allerdings noch unklar.

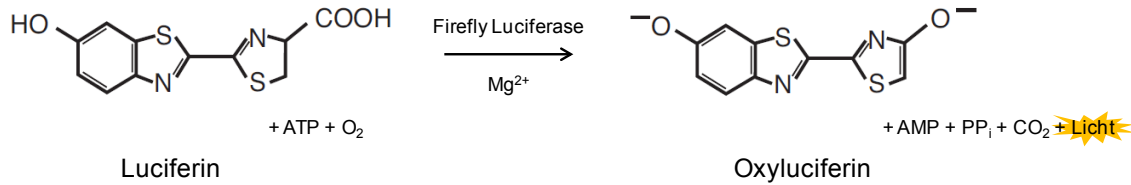


Abb. 4.4: Firefly-Luciferase-katalysierte Umsetzung des Luciferins in einer Biolumineszenzreaktion

Unter Verbrauch von ATP und molekularem Sauerstoff katalysiert die Firefly-Luciferase in Anwesenheit von Magnesiumionen die Reaktion von Luciferin zu Oxyluciferin, wobei die frei werdende Energie in Form von Licht-Quanten abgegeben wird. Diese Biolumineszenz wird im Rahmen der Reporterstudie quantifiziert. Abbildung modifiziert nach dem Protokoll zum „Luciferase Assay System“ der Firma Promega (# TB281).

Gleichzeitig zum NFAT-abhängigen Reporter gen wurde ein konstitutiv exprimiertes Reporter gen in die Zellen transfiziert, das zur Normierung der Transfektionseffizienz genutzt werden kann. Ein solches Reporter gen ist hinter einen konstitutiv aktiven Promoter kloniert, daher ist seine Expression unabhängig von Transkriptionsfaktoren und einzig von der Menge an Konstrukt in der Zelle abhängig. Dazu wurde der pGL4.74[hRluc/TK] Vektor der Firma Promega verwendet, der unter dem konstitutiv aktiven *HSV-TK*-Promoter (*Herpes-Simplex-Virus* Thymidin Kinase Promoter) die Luciferase der Seefeder *Renilla reniformis* als Reporter gen exprimiert. Dieses Enzym, das als *Renilla*-Luciferase bezeichnet wird, katalysiert die Oxidation von Coelenterazin in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff zu *Renilla*-Oxyluciferin und auch in dieser Reaktion wird die freigesetzte Energie in Form von Photonen abgegeben (siehe Abb. 4.5). Die hierbei entstehende Lumineszenz ist dabei jedoch deutlich stabiler als die der Firefly-Luciferase und kann daher länger nachgewiesen werden (Jones et al. 1999).

Bei der durchgeführten NFAT-Reporter genstudie wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen mit den beiden vorgestellten Reporter genkonstrukten transfiziert und anschließend mit TSH stimuliert. Hierbei sollte analysiert werden, ob TSH eine Aktivierung des NFAT Proteins erzeugen kann. Dies sollte auch in Anwesenheit des Calcineurin-Inhibitors Cyclosporin A (CsA) untersucht werden. Als allgemeine Positivkontrolle für die NFAT-Aktivierung wurde das Calcium Ionophor Ionomycin verwendet.

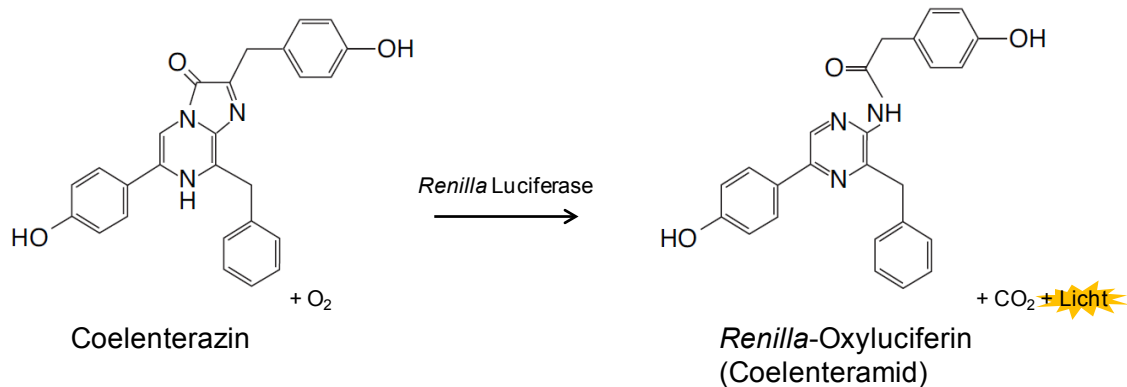


Abb. 4.5: *Renilla*-Luciferase-katalysierte Umsetzung des Coelenterazins in einer Biolumineszenzreaktion

Unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff katalysiert die *Renilla*-Luciferase die Reaktion von Coelenterazin zu *Renilla*-Oxyluciferin, wobei die frei werdende Energie in Form von Licht-Quanten abgegeben wird. Diese Biolumineszenz wird im Rahmen der Reporterstudie quantifiziert. Abbildung modifiziert nach dem Protokoll zum „*Renilla*-Luciferase Assay System“ der Firma Promega (# TM055).

Zellaussaat, Transfektion und Stimulation

Für die Transfektion wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen auf einer 6-well Platte ausgesät und am nächsten Tag in drei wells mit den beiden Reportergenkonstrukten transfiziert (vgl. Abschnitt 4.2.1.4). Es folgte eine Inkubation für 4 Stunden im Brutschrank, anschließend wurde das Zellmedium einschließlich des Transfektionsgemisches aus den drei wells sowie einem well ohne Transfektionsgemisch vollständig abgenommen und durch 1,5 ml Zellmedium (Komplettmedium) ersetzt. Nach 3 Stunden weiterer Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen, bei denen der Mediumwechsel durchgeführt worden war, auf eine 24-well Platte ausgesät. Dieser Schritt diente dem Vergleich von stimulierten und unstimulierten Zellen derselben Transfektion. Dazu wurde das Medium aus den ausgewählten wells entfernt und 400 μ l Trypsin hinzugefügt. Die Zellen wurden für 3 Minuten im Brutschrank inkubiert, durch vorsichtiges „Klopfen“ vollständig vom Boden gelöst und in die wells jeweils 3 ml Komplettmedium hinzugegeben. Darin wurden die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt und anschließend in einem Volumen von 750 μ l in jeweils vier wells einer 24-well Platte ausgesät. Nach 16 h Inkubation im Brutschrank wurde das Medium abgenommen und durch 1 ml serumfreies IMDM-Medium ersetzt. Eine erneute Inkubation für 22 h im Brutschrank folgte, ehe die Zellen mit dem Antagonisten CsA und/oder Stimulus behandelt wurden. Die Behandlung mit 1 μ M CsA erfolgte dabei immer 30 Minuten vor Zugabe von 50 mU/ml TSH oder 400 nM Ionomycin.

Zelllyse und Messung der Luciferaseaktivität

Die Zelllyse und Messung der Luciferaseaktivität erfolgte in Anlehnung an das Protokoll zum „Luciferase Assay System“ der Firma Promega (# TB281). Nach 6 Stunden wurde die Stimulation mit TSH oder Ionomycin durch Lysieren der Zellen gestoppt. Dafür wurde das Zellmedium abgenommen und jeweils 400 µl hypertoner Lysepuffer hinzugegeben. Die 24-well Platte wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur auf einer Wippe inkubiert und die Zellen anschließend durch Auf- und Abpipettieren vom Boden der wells gelöst. Die Proben wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 5 Minuten bei 1500 x g zentrifugiert. Vom Überstand wurden jeweils 80 µl in zwei wells einer weißen 96-well Mikrotiterplatte mit weißem Plattenboden pipettiert.

Die anschließende Lumineszenzmessung wurde in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (FLUOstar) durchgeführt. Zuerst wurde die Aktivität der Firefly-Luciferase in den Proben bestimmt. Dazu wurde das Gerät gemäß dem Protokoll so eingestellt, dass es 2 Sekunden nach Start der Messung automatisch 30 µl Luciferasesubstrat („Luciferase Assay System“) in jeweils eine der beiden Proben injizierte. Gemessen wurden die relativen Lichteinheiten (engl.: „relative light units“, RLU) jede Sekunde in einem Zeitraum von 9 Sekunden, so dass zwei Lumineszenzmessungen vor, eine während sowie sieben nach der Injektion erfolgten.

Im Anschluss wurde zu den noch nicht gemessenen Proben 30 µl Coelenterazin (10 µM) hinzupipettiert. Auch hier wurde die Lumineszenz insgesamt 9 Sekunden lang jede Sekunde gemessen.

Auswertung

Zur Auswertung wurde die Autolumineszenz der Proben (Mittelwert der Messwerte vor der Injektion) vom jeweiligen Messwert abgezogen und die korrigierten Werte während bzw. nach der Injektion des Luciferasesubstrates zu einer Summe addiert. Diese wurde auf den Mittelwert der *Renilla*-Luciferase Aktivität der jeweiligen Probe normalisiert.

4.5.4 Kerntranslokation eines NFAT-eGFP Fusionsproteins

Das verbesserte grün fluoreszierende Protein (engl.: „enhanced green fluorescent protein“, eGFP) ist eine modifizierte Variante des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) der pazifischen Qualle *Aequorea victoria*. GFP sowie seine modifizierten Versionen können als Marker für andere Proteine benutzt werden (Chalfie et al. 1994), wozu die DNA des zu untersuchenden Proteins mit der von GFP zuerst fusioniert und anschließend in eine Zelle transfiziert werden muss. Die Expression und Lokalisation

des Fusionsproteins kann dann mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops dargestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein DNA-Konstrukt, welches für ein NFATc3-eGFP Fusionsprotein kodierte, in FTC 133 wt TSH-R Zellen transfiziert. Danach sollte die Lokalisation von NFATc3 und eine mögliche Kerntranslokalisierung während einer Stimulation mit TSH oder dem Calcium Ionophor A23187 im Fluoreszenzmikroskop visualisiert und dokumentiert werden.

Etwa 6×10^4 FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen (Durchmesser 24 mm) in 6-well Platten ausgesät, über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag wie unter 4.2.1.4 beschrieben mit dem NFATc3-eGFP DNA-Konstrukt transfiziert. Etwa 24 Stunden später wurde die Messung durchgeführt, dafür wurde ein Deckgläschen aus der 6-well Platte entnommen, in die Mitte einer Perfusionskammer eingesetzt und mit 400 µl HBS⁺⁺⁺ überschichtet. Mit einem 20er Ölimmersionsobjektiv wurde ein geeignetes Blickfeld ausgewählt und mit Hilfe des Computerprogramms Tillvision® bei einem sog. „Binning“ (Zusammenfassen benachbarter Pixel) von 4 x 4 die zu messenden Zellen markiert. Das Experiment wurde gestartet und über einen Zeitraum von 60 Minuten alle 5 Sekunden eine Aufnahme bei einer Exzitationswellenlänge von 488 nm gemacht. Die Stimulation der Zellen erfolgte sofort nach dem Start der Messung, stimuliert wurde mit 50 mU/ml TSH oder 10 µM A23187.

4.5.5 Bestimmung der Zellproliferation mittels XTT

Die Zellproliferation wurde mit Hilfe eines colorimetrischen XTT-Tests bestimmt. Dieser wurde erstmals im Jahr 1988 von der Arbeitsgruppe Scudiero et al. präsentiert (Scudiero et al. 1988) und später durch die zusätzliche Verwendung des Elektronenakzeptors PMS (Phenazinmethosulfat) optimiert (Roehm et al. 1991). Er bietet gegenüber dem nach gleichem Prinzip funktionierenden und damals schon bekannten MTT-Assay den Vorteil, dass das gebildete Formazan in H₂O löslich ist.

In dem Test wird das gelbe Monotetrazoliumsalz XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid) zu dem orangeroten Formazan umgesetzt. Der genaue Mechanismus ist bis heute nicht vollständig verstanden, aber man weiß, dass das Tetrazoliumsalz durch mitochondriale Dehydrogenasen in Komplex I der Atmungskette NADH-abhängig über die Zwischenstufe eines kurzlebigen Tetrazoliumradikals zu Formazan reduziert wird (siehe Abb. 4.6) (Rich et al. 2001). Da XTT auf Grund seiner negativen Ladung nicht in die Zelle gelangen kann, ist zusätzlich ein Elektronentransport über die Plasmamembran nötig. Aus diesem

Grund ist auch ein extrazellulärer Elektronenakzeptor hilfreich, in dessen Anwesenheit die Reaktion deutlich effizienter verläuft.

Das gebildete Formazan kann mit Hilfe einer Absorptionsmessung bei 450 nm nachgewiesen werden. Da die zu seiner Bildung erforderlichen Enzyme sehr bald nach dem Zelltod inaktiviert werden, ist diese Absorption direkt proportional zur Anzahl von lebenden, metabolisch aktiven Zellen. Um eine unspezifische Absorption zu korrigieren, ist außerdem eine zweite Absorptionsmessung bei 650 nm erforderlich.

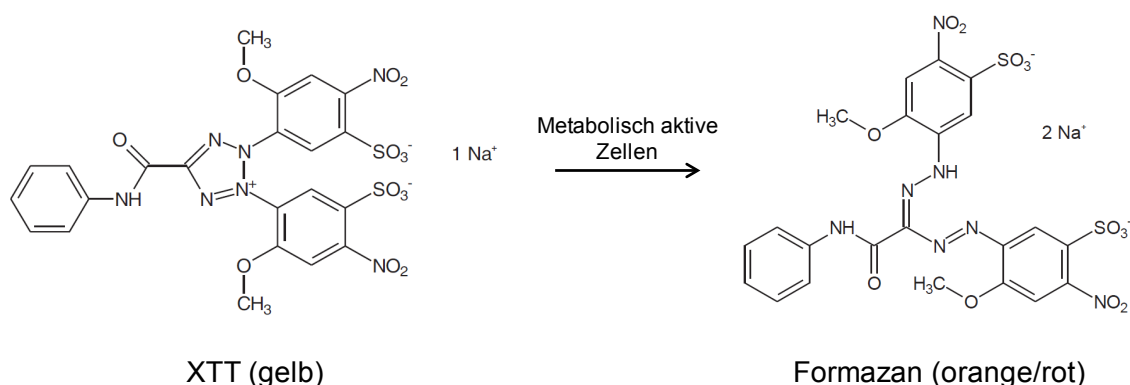


Abb. 4.6: Nachweisreaktion zur Bestimmung der Zellproliferation mittels XTT

Das gelbe Tetrazoliumsalz XTT wird von metabolisch aktiven Zellen zu dem orange/roten Formazan umgesetzt. Abbildung modifiziert nach dem Protokoll zum „Cell Proliferation Kit II (XTT)“, Version 17, der Firma Roche.

Im durchgeführten Zellproliferationstest wurden FTC 133 wt TSH-R sowie RO82-W-1 Zellen, die beide zuvor mit siRNA transfiziert worden waren, mit TSH stimuliert und über einen Zeitraum von 192 Stunden (8 Tage) mit unstimulierten Zellen verglichen.

Zur Versuchsvorbereitung wurden FTC 133 wt TSH-R sowie RO82-W-1 Zellen wie unter 4.2.1.4 beschrieben einen Tag nach ihrer Aussaat in eine 6-well Platte in jeweils einem well mit RCAN1 oder Kontroll-siRNA transfiziert und 4 h später ein Mediumwechsel durchgeführt. Etwa 27 h später wurde das Zellkulturmedium abgenommen und durch jeweils 1,5 ml serumfreies Medium ersetzt. Es folgte eine 24 stündige Inkubation im Brutschrank. Danach wurden die transfizierten Zellen für den XTT-Assay nacheinander nach dem folgenden Protokoll ausgesät: Zuerst wurde das Medium in einem well vollständig entfernt und durch 0,5 ml Trypsin ersetzt. Die Zellen wurden 3 Minuten im Brutschrank inkubiert und anschließend durch leichtes „Klopfen“ vom Boden der Platte gelöst. Um das Trypsin zu inaktivieren, wurde in dieses well 5 ml Medium, das 10 % FCS enthielt, hinzugegeben und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Nach einer Zentrifugation für 6 Minuten bei 100 x g wurde die Zellzahl mit Medium, das 0,2 % FCS enthielt, auf 10.000 je Milliliter eingestellt. Von

dieser Zellsuspension wurden jeweils 3,5 ml in zwei 15 ml Röhrchen überführt und zu dem einem 3,5 µl PBS hinzugefügt, zu dem anderen 3,5 µl 50 U/ml TSH, das in PBS gelöst war. Danach wurden die Zellen auf eine 96-well Platte ausgesät, dazu wurden in eine Hälfte der Platte jeweils 100 µl pro well von den mit PBS behandelten Zellen ausgesät, in der anderen 100 µl der mit TSH-stimulierten Zellen. Die äußeren wells der Platte wurden nicht mit Zellen versehen, stattdessen wurden dort nur jeweils 100 µl Medium eingefüllt, um ein Austrocknen der Randwells zu verhindern und später auch eine Absorption dieser Leerwerte bestimmen zu können. Die Zellen wurden bis zur Messung im Brutschrank inkubiert.

Die Zellen, die nicht ausgesät worden waren, wurden für 6 Minuten bei 100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 40 µl SDS-haltigen Lysepuffer aufgenommen. Die jeweiligen Proben wurden bei -20 °C eingefroren und anschließend zur Überprüfung der Herunterregulations-Effizienz protein-biochemisch untersucht.

Eine Bestimmung der Zellproliferation mittels XTT-Assay wurde etwa 24; 96; 144; 168 und 192 Stunden nach Zellaussaat durchgeführt. Dafür wurden 1,8 ml HBS mit 1,5 ml „XTT labeling reagent“ sowie 24 µl „XTT electron coupling reagent“ (beides Cell Proliferation Kit II (XTT)) gemischt. Auf beiden 96-well Platten (RCAN1 siRNA transfizierte sowie Kontroll-siRNA transfizierte Zellen) wurde von je fünf wells mit nur Medium (Leerwert), mit PBS stimulierten Zellen sowie mit 50 mU/ml TSH behandelten Zellen das Medium abgenommen und 100 µl der vorher angesetzten Mischung hinzugegeben. Die Zellen wurden für 45 Minuten im Brutschrank inkubiert und anschließend die zu messenden Proben (entspricht den Zellüberständen) auf eine neue 96-well Platte umpipettiert. Die Absorption wurde bei 450 nm und 650 nm im Mikrotiterplatten-Lesegerät (FLUOstar) bestimmt. Zur Auswertung wurde der Mittelwert der Leerwerte von den Proben, die Zellen enthielten, subtrahiert. Da nur die Zellüberstände gemessen wurden, war die unspezifische Absorption bei 650 nm bei allen Proben etwa gleich hoch und wurde daher nicht in die Auswertung mit einbezogen.

Nach der ersten Zellproliferationsbestimmung wurde außerdem ein Mediumwechsel auf den 96-well Platten vorgenommen. Dazu wurde das alte Medium abgenommen und durch jeweils 100 µl Komplettmedium ersetzt.

4.5.6 Untersuchung der Koloniebildung

Untersuchungen zur Koloniebildungsfähigkeit von Zellen wurden erstmals im Jahr 1955 von Puck et al. dargestellt (Puck et al. 1955) und im Jahr darauf präzisiert (Puck et al. 1956). Bei dieser Art von Untersuchung wird eine sehr geringe Anzahl von

Zellen in eine Zellkulturschale ausgesät und nach einer gewissen Zeit angefärbt (je nach Zellart etwa 1-3 Wochen). Grundlage dieses Tests ist, dass jede vitale Zelle sich bei ihrer Aussaat am Boden der Platte anheftet, dort proliferiert und dadurch genau eine Kolonie bildet. Die Auswertung erfolgt über die Anzahl der gebildeten Kolonien. Da die Größe dieser Kolonien keine Rolle spielt, wird eine gesteigerte Proliferationsrate bei dieser Art von Untersuchung nicht erfasst. Der Test kann unter anderem verwendet werden, die Effektivität zytotoxischer Agenzien zu ermitteln (Brown et al. 2005; Franken et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit sollte die oben vorgestellte Technik dazu genutzt werden, um den Einfluss von TSH bei gleichzeitiger Herunterregulation von RCAN1 auf die Koloniebildungsfähigkeit von FTC 133 wt TSH-R Zellen näher zu untersuchen. Das angewandte Protokoll entspricht weitgehend dem von Franken et al. (Franken et al. 2006).

Zur Vorbereitung wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen wie unter 4.2.1.4 beschrieben einen Tag nach ihrer Aussaat in eine 6-well Platte in jeweils zwei wells mit RCAN1 oder Kontroll-siRNA transfiziert und 4 h später ein Mediumwechsel durchgeführt. Etwa 27 h später wurde das Zellmedium abgenommen und durch jeweils 1,5 ml serumfreies IMDM-Medium ersetzt. Es folgte eine 24 stündige Inkubation im Brutschrank, danach wurden jeweils gleich transfizierte Zellen (sowohl RCAN1 als auch Kontroll-siRNA transfiziert) einmal mit 50 mU/ml TSH stimuliert und in dem anderen well unbehandelt gelassen. Nach 15 Stunden Stimulation wurden die Zellen für die Untersuchung der Koloniebildung ausgesät. Dazu wurde zunächst das Zellmedium abgenommen und jeweils 500 µl Trypsin in die vier wells der 6-well Platte gegeben. Die Zellen wurden 3 Minuten im Brutschrank inkubiert und anschließend durch leichtes „Klopfen“ vom Boden der Platte gelöst. Um das Trypsin zu inaktivieren, wurde in jedes well 3 ml IMDM Komplettmedium hinzugegeben und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Von den mit Kontroll-siRNA transfizierten, unstimulierten Zellen wurden 20 µl Zellsuspension entnommen und eine Zellzahlbestimmung durchgeführt. Dabei wurde vorausgesetzt, dass diese Zellzahl für alle Proben in gleicher Weise gilt. Im Folgenden wurden die Zellen mit IMDM-Medium, das 1 % FCS, jedoch keine weiteren Zusätze enthielt, auf eine Konzentration von 1000 Zellen pro Milliliter eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurde 1 ml (also 1000 Zellen) auf eine 10 cm Zellkulturschale ausgesät und 7 ml IMDM-Medium, das 1 % FCS enthielt, hinzugefügt. Teilweise wurden Doppelbestimmungen angefertigt. Die Zellen wurden zur Anhaftung und Koloniausbildung im Brutschrank inkubiert.

Die Zellen, die nicht ausgesät worden waren, wurden für 6 Minuten bei 100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 200 µl SDS-

haltigen Lysepuffer aufgenommen. Die jeweiligen Proben wurden bei -20 °C eingefroren und anschließend zur Überprüfung der Herunterregulations-Effizienz proteinbiochemisch untersucht.

Zur letztendlichen Ausbildung der Kolonien sollten die Zellen beste Wachstumsbedingungen haben. Daher wurde etwa 30 Stunden nach Zellaussaat das Zellmedium abgenommen und durch 8 ml IMDM-Komplettmedium ersetzt. Es folgte eine etwa 9 tägige Inkubation im Brutschrank. Zur Anfärbung der Kolonien wurde dann das Medium entfernt, die Zellen kurz mit 15 ml PBS gewaschen und anschließend mit 8 ml CFA-Färbelösung überschichtet. Nach etwa 20 Minuten wurde die Lösung wieder abgenommen und die angefärbten Kolonien zwei Mal mit PBS und anschließend zwei Mal mit H₂O (entmineralisiert) gewaschen. Nachdem sie getrocknet waren, konnten die einzelnen Kolonien manuell ausgezählt werden.

4.5.7 Boyden-Chamber Migrationstest

Mit Hilfe eines sog. Boyden-Chamber Migrationstests, der erstmals im Jahr 1962 von S. Boyden verwendet wurde, um die Chemotaxis von Leukozyten zu untersuchen (Boyden 1962), kann die Migration von Zellen untersucht werden. Die Basis des Tests bilden zwei übereinander liegenden Kammern, welche über eine Poren enthaltende Membran miteinander verbunden sind und während des Tests mit Medium gefüllt sind. Zellen, deren Migration untersucht werden soll, werden in die obere Kammer ausgesät und haben die Möglichkeit, innerhalb einer bestimmten Zeit durch die Poren der Membran in das untere Kompartiment zu migrieren. Wenn sich im oberen wie im unteren Kompartiment das gleiche Medium mit den gleichen Substanzen befindet, wird eine eher zufällige Zellbewegung untersucht, die als Chemokinese bezeichnet wird. Möglich ist aber auch die Analyse einer zielgerichteten Zellmigration entlang eines Stoffkonzentrationsgradienten hin zu einem bestimmten Lockstoff. Bei diesem als Chemotaxis bezeichneten Vorgang werden die Lockstoffe in der Regel dem Medium in der unteren Kammer zugesetzt.

Im hier durchgeführten Boyden-Chamber Migrationstest nach einem Protokoll von Schmidt et al. (Schmidt et al. 2006) wurde die Zellmigration von FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit TSH bei gleichzeitiger Herunterregulation des Proteins RCAN1 untersucht (siehe auch Abb. 4.7).

Dafür wurden die Zellen einen Tag nach ihrer Aussaat in eine 6-well Platte wie unter 4.2.1.4 beschrieben in jeweils zwei wells mit RCAN1 oder Kontroll-siRNA transfiziert und 4 Stunden später ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Zellen in den übrigen beiden wells wurden nicht transfiziert, jedoch ansonsten genauso behandelt wie die transfizierten Zellen. Es folgte eine etwa 27 stündige Inkubation im Brutschrank.

Dann wurde das Zellmedium abgenommen und durch jeweils 1,5 ml serumfreies IMDM-Medium ersetzt. Etwa 24 Stunden später erfolgte die Stimulation mit TSH über einen Zeitraum von 15 Stunden durch die Zugabe von 1,5 µl TSH (50 U/ml) mit einer finalen Konzentration von 50 mU/ml TSH. Im Anschluss wurden die Zellen für den Boyden-Chamber Migrationstest ausgesät. Dazu wurde das Zellmedium zunächst entfernt und jeweils 500 µl Trypsin zugegeben. Die Zellen wurden 3 Minuten im Brutschrank inkubiert und anschließend durch leichtes „Klopfen“ vom Boden der Platte gelöst. Um das Trypsin zu inaktivieren, wurde in jedes well 3 ml IMDM-Medium hinzugegeben, das 10 % FCS enthielt, und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die Zellen wurden 6 Minuten bei 100 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in IMDM-Medium aufgenommen, das 0,2 % FCS enthielt. Dabei wurde die Zellzahl jeweils auf eine Konzentration von 2000 Zellen pro Milliliter eingestellt. Zellen, die zuvor mit TSH stimuliert worden waren, wurden erneut mit TSH (finale Konzentration von 50 mU/ml) stimuliert. Bevor die Zellen in die obere Boyden-Chamber Kammer ausgesät werden konnten, wurden nun zuerst die unteren Kammern, die von zwei 24-well Platten gebildet wurden, mit Medium gefüllt. Dafür wurden in insgesamt 36 wells jeweils 500 µl IMDM-Medium, das 10 % FCS enthielt, eingefüllt und die Hälfte der Kammern durch die Zugabe von jeweils 1,5 µl TSH (50 U/ml) auf eine finale Konzentration von 50 mU/ml TSH gebracht. Anschließend wurde jeweils eine fluoreszenzdichte Migrationskammer mit einer Porengröße von 8 µm (BD Biosciences, Heidelberg) in ein well der beiden 24-well Platten gehängt und rasch je 500 µl der Zellsuspensionen in 6-fach Bestimmungen ausgesät. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass die mit TSH-stimulierten Zellen in die Kammern ausgesät wurden, die in einem well mit TSH hingen. Für die Migration wurden die Zellen 8 Stunden im Brutschrank inkubiert.

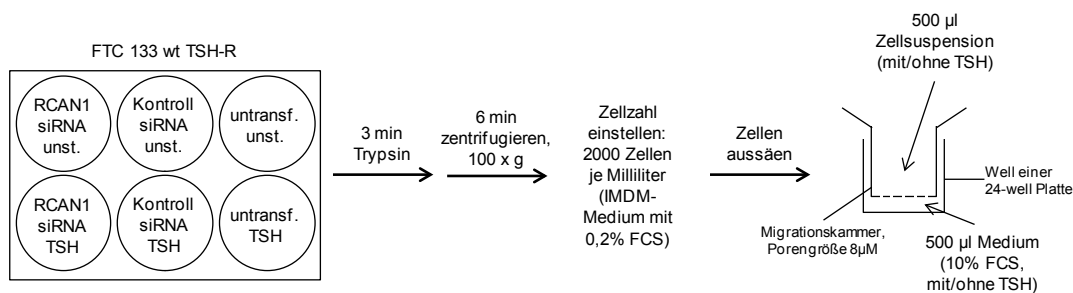


Abb. 4.7: Boyden-Chamber Migrationstest

Je nach Bedingung wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen mit siRNA gegen RCAN1 oder Kontroll-siRNA transfiziert oder untransfizierte Zellen (untransf.) verwendet. Nach einer Stimulation für 15 h mit TSH (50 mU/ml) oder unter unstimulierten Bedingungen (unst.) wurden sie für einen Boyden-Chamber Migrationstest ausgesät. Für Einzelheiten siehe Text.

Die Zellen, die nicht ausgesät worden waren, wurden für 6 Minuten bei 100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 200 µl SDS-haltigen Lysepuffer aufgenommen. Die jeweiligen Proben wurden bei -20 °C eingefroren und anschließend zur Überprüfung der Herunterregulations-Effizienz proteinbiochemisch untersucht.

Zur Beendigung der Migration und anschließenden Auswertung des Versuches wurden die Zellen fixiert. Dafür wurde zuerst das Zellmedium sowohl aus der unteren als auch der oberen Kammern abgenommen und in beide Kammern jeweils 500 µl Paraformaldehyd (PFA)-Lösung (4 %) in PBS hinzugefügt. Die Fixierung erfolgte über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C. Am nächsten Morgen wurde die Lösung abgenommen und jede Kammer 3 Mal mit 1 ml PBS gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran der Boyden-Chamber Kammer mit der Seite der nicht migrierten Zellen auf ein Deckgläschen transferiert und die migrierten Zellen mit einem Tropfen Fluoreszenz-Eindeckmedium, das 4,6-diamino-2-phenylindol (DAPI) enthielt, eingedeckt. Zur Auswertung wurde die Anzahl der migrierten Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop bestimmt.

4.5.8 Messung der cAMP-Akkumulation

Das Nukleotid cAMP (zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat) wird aus ATP durch membrangebundene Adenylylcyclasen (AC) gebildet, die ihrerseits von G_{α_s} -gekoppelten Rezeptoren aktiviert und G_{α_i} -gekoppelten Rezeptoren inhibiert werden. Es gilt als eines der wichtigsten sekundären Botenstoffe, das seine vielfältigen Effekte in erster Linie durch die Aktivierung von Proteinkinasen des Typs A (PKA) bewirkt.

Die hier durchgeführte Bestimmung der cAMP-Akkumulation geht auf ein Protokoll von Salomon zurück (Salomon et al. 1974), das später modifiziert wurde (Dumuis et al. 1988). Hier wird die Bildung von cAMP mit [^3H]-Adenin metabolisch markiert, dieses dann über eine sequenzielle Säulenchromatografie aufgereinigt und mittels Szintillationsmessung quantifiziert. Dafür werden Zellen zuerst mit [^3H]-Adenin inkubiert, das daraufhin in deren Stoffwechsel eingebracht und zu Tritium-markiertem ATP phosphoryliert wird. Gleichzeitig wird der Abbau von cAMP durch eine Inhibition von Phosphodiesterasen mit 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) blockiert, wodurch es bei einer Aktivierung der AC zur Akkumulation von Tritium-markiertem cAMP kommt. Dieses kann nach einer Extraktion des Zytoplasmas über eine Ionenaustauschchromatographie mittels Dowex Resin AG50-W Säulen (8% Quervernetzung) von ATP getrennt und anschließend nach dem Prinzip einer Verteilungschromatographie über Aluminiumoxid-Säulen weiter aufgereinigt werden.

Schließlich wird die Radioaktivität mittels Flüssigkeitsszintillationsmessung bestimmt, die ein Maß für die cAMP-Produktion in den Zellen ist.

Bei der durchgeführten Bestimmung der cAMP-Akkumulation wurden die Zellen mit TSH sowie, als Positivkontrolle für den Versuchsaufbau, mit Forskolin (FSK) stimuliert.

Dazu wurden 5×10^4 FTC 133 wt TSH-R oder HTC 238 Zellen pro well auf einer 12-well Platte, die mit Poly-L-Lysin beschichtet worden war, ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte die Beladung mit $2 \mu\text{Ci/ml}$ [^3H]-Adenin ($27,2 \text{ Ci/mmol}$) für 4 h im Brutschrank. Anschließend wurde die Lösung von den Zellen abgesaugt und $500 \mu\text{l}$ serumfreies IMDM-Medium mit 1 mM IBMX und $0,1 \%$ BSA auf die Zellen gegeben. Die Stimulation der Zellen erfolgte direkt im Anschluss durch die Zugabe von $0,5 \mu\text{l}$ 50 U/ml TSH bzw. $0,5 \mu\text{l}$ 100 FSK mit einer finalen Konzentration von 50 mU/ml TSH bzw. $100 \mu\text{M}$ FSK. Die Zellen wurden für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert, anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die zytoplasmatische Fraktion durch die Zugabe von 1 ml Trichloressigsäure (5%) extrahiert. Der gesamte Überstand wurde auf Dowex Resin Säulen, die zuvor mit 10 ml HCl (1 M) und 10 ml H_2O gewaschen worden waren, überführt. Die Säulen wurden nach dem Durchfluss des Überstandes mit 4 ml H_2O gewaschen und anschließend mit 10 ml H_2O direkt auf die Aluminiumoxid Säulen eluiert. Diese wurden dann mit 1 ml $0,1 \text{ M}$ Imidazol-Puffer gewaschen, bevor sie mit 5 ml der gleichen Lösung in die Szintillationsgefäße eluiert wurden. Zur Versuchsauswertung wurde die Tritium-abhängige Betastrahlung in einem Szintillationsmessgerät (WS1414, PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim) nach Zugabe von 12 ml Szintillationsflüssigkeit in einem Zeitraum von 3 Minuten bestimmt und als Anzahl der Zerfälle pro Minute angegeben.

4.6 Auswertung und Statistik

Die Auswertung der Daten erfolgte, soweit nicht anders angegeben, mit dem Programm Excel 2007 (Microsoft). Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (engl.: „standard deviation“, SD) dargestellt. Statistische Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mit einem zweiseitigen „Student's t-test“, wenn möglich für verbundene Stichproben, ermittelt. Für den Vergleich mehrerer Gruppen wurde mit Hilfe des Programms InStat (GraphPad) zuerst eine einfaktorielle Varianzanalyse („analysis of variance“ (ANOVA)) durchgeführt und anschließend ein Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey vorgenommen. Unterschiede mit einem p -Wert kleiner als $0,05$ wurden mit * gekennzeichnet, die mit einem p -Wert kleiner als $0,01$ mit ** und Unterschiede mit einem p -Wert kleiner als $0,001$ mit ***.

5 Ergebnisse

5.1 Funktioneller Nachweis des humanen TSH-Rezeptors in follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien

FTC 133 wt TSH-R Zellen sind humane follikuläre Schilddrüsenkarzinomzellen, die nach stabiler Transfektion den humanen TSH-Rezeptor (TSH-R) überexprimieren (Büch et al. 2008). Da diese Zellen im Folgenden als Modellsystem zur Untersuchung von Signalwegen des humanen TSH-R dienen sollten, wurde zuerst die Funktionalität des überexprimierten Rezeptors überprüft. Im Zuge dieser Charakterisierungen wurden zusätzlich weitere humane follikuläre Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien auf die endogene Expression eines funktionellen TSH-R untersucht.

5.1.1 Analyse der TSH-abhängigen cAMP-Bildung in follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien

Zunächst wurde in diesem Zusammenhang der G_s -Signalweg analysiert, dessen Aktivierung in Folge einer TSH-R Stimulation als klassischer Signalweg gilt und sehr gut untersucht ist (siehe 3.3.3). Da nach der Aktivierung von G_{α_s} -Proteinen über Adenylylcyclasen (AC) die Bildung von cAMP initiiert wird (siehe 3.2.2.1), kann nach einer Rezeptoraktivierung bei einer Inhibition von Phosphodiesterasen über die Akkumulation von cAMP indirekt dessen Funktionalität nachgewiesen werden. Im durchgeführten Versuch wurden die beiden follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien FTC 133 wt TSH-R und HTC 238 mit dem TSH-R Agonisten Thyreotropin (TSH) oder mit Forskolin (FSK) stimuliert. FSK aktiviert AC unabhängig von G-Proteinen (Positivkontrolle). Gleichzeitig wurde der Abbau von cAMP durch die Inhibition von Phosphodiesterasen mit 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) verhindert.

In beiden Zelllinien konnte TSH die Bildung von cAMP steigern (Abb. 5.1). Allerdings war dieser Effekt in den FTC 133 wt TSH-R Zellen sehr deutlich, in den HTC 238 Zellen dagegen nur sehr schwach ausgeprägt. Im Vergleich zu basalen Bedingungen war die cAMP-Akkumulation in FTC 133 wt TSH-R Zellen um mehr als das 23-fache erhöht, in HTC 238 Zellen dagegen nur um das 2,5-fache. Die Stimulation mit FSK führte sowohl in FTC 133 wt TSH-R als auch in HTC 238 Zellen zur Erhöhung der cAMP-Akkumulation auf das 34- bzw. 18-fache. Dass beide Zelllinien auf eine TSH-Stimulation mit einer gesteigerten cAMP-Produktion reagierten, ist ein starkes Indiz dafür, dass in beiden Zelllinien funktioneller TSH-R exprimiert wurde. Da die cAMP-Akkumulation nach einer TSH-Stimulation in den FTC 133 wt TSH-R

Zellen jedoch deutlich höher war, exprimierten diese den Rezeptor vermutlich in stärkerem Ausmaß.

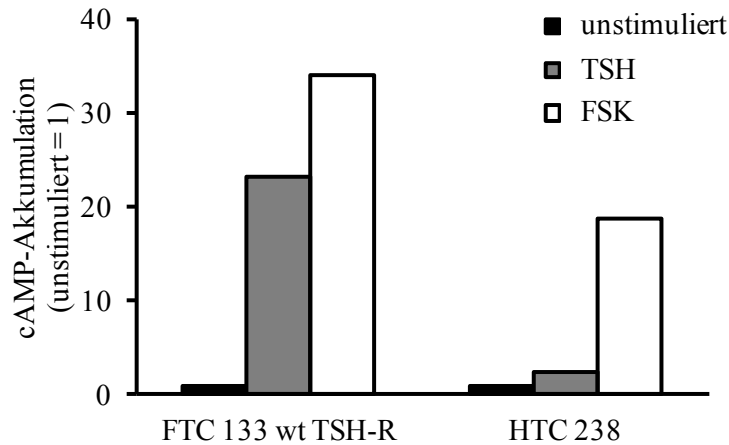


Abb. 5.1: cAMP-Akkumulation in FTC 133 wt TSH-R und HTC 238 Zellen nach Stimulation TSH oder Forskolin

FTC 133 wt TSH-R Zellen (links) oder HTC 238 Zellen (rechts) wurden für 4 h mit Tritium-markiertem Adenin inkubiert und anschließend unter Behandlung mit 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX, 1 μ M) für 30 min mit TSH (50 mU/ml) oder Forskolin (FSK, 100 μ M) stimuliert. Das entstandene cAMP wurde mittels Szintillationsmessung nach säulenchromatographischer Aufreinigung quantifiziert und auf den Basalwert der jeweiligen Zelllinie normiert. Dargestellt ist das Quadruplikat eines Experiments.

5.1.2 Analyse der TSH-abhängigen ERK 1/2-Aktivierung in follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien

Der Rezeptor koppelt jedoch nicht nur an G_s -Proteine, sondern kann an die G-Proteine aller 4 Familien (G_s , $G_{q/11}$, $G_{i/o}$, $G_{12/13}$) binden. Während bisher keine physiologischen Prozesse gezeigt werden konnten, die ausschließlich über die Aktivierung von $G_{i/o}$ initiiert werden, konnte in früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass über die Aktivierung von G_{13} die Mitogen-aktivierte Proteinkinase ERK 1/2 (extrazellulär Signal-regulierte Proteinkinase 1/2) phosphoryliert und aktiviert wird (Büch et al. 2008). Um eine TSH-R vermittelte Aktivierung von G_s -unabhängigen Signalwegen zu überprüfen, wurde der Phosphorylierungsstatus von ERK 1/2 nach der Stimulation mit TSH in FTC 133 wt TSH-R und anderen Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien analysiert. Hierbei wurden verschiedene Zeitintervalle für die Stimulation gewählt, um ein großes Zeitfenster abzudecken und so die optimale Stimulationszeit zu erfassen.

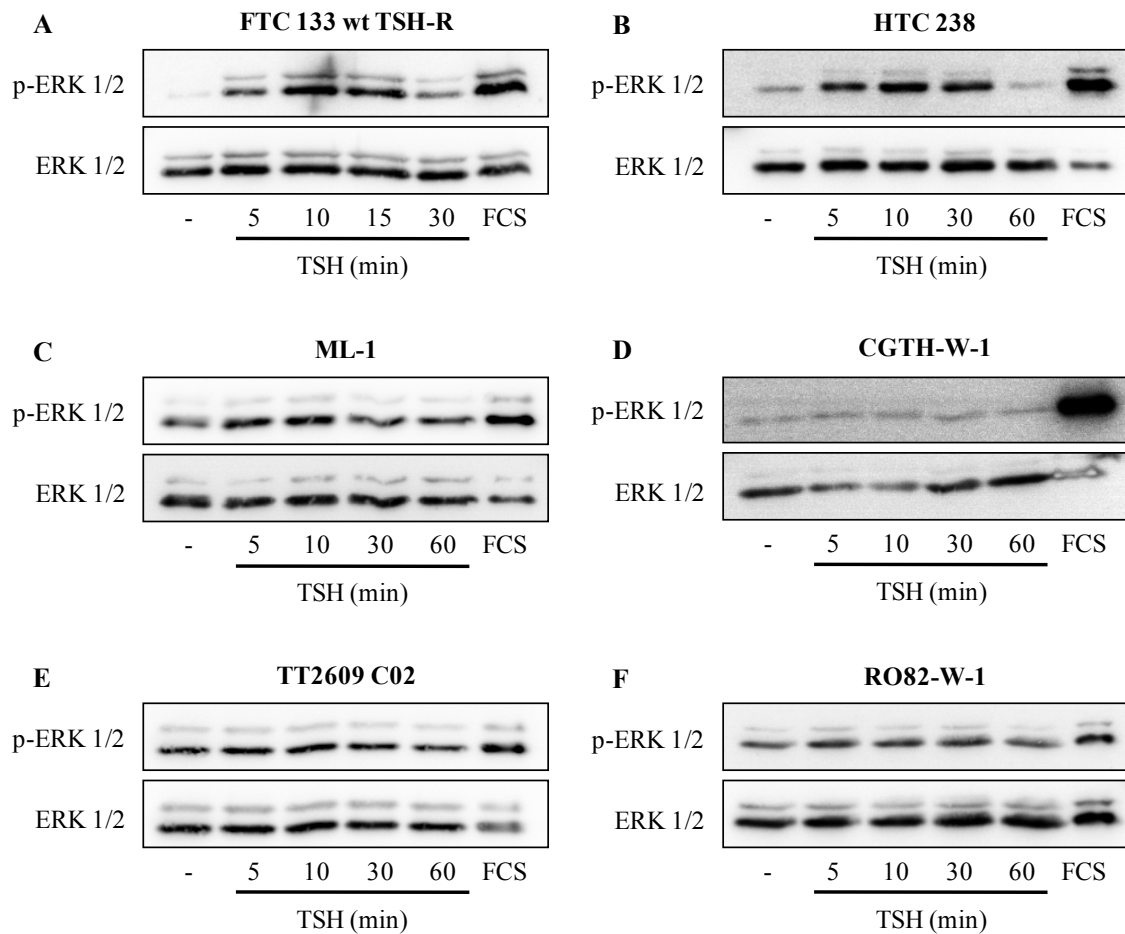


Abb. 5.2: ERK 1/2-Phosphorylierung in follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien nach Stimulation mit TSH oder FCS

(A) FTC 133 wt TSH-R, (B) HTC 238, (C) ML-1, (D) CGTH-W-1, (E) TT2609 C02 oder (F) RO82-W-1 Zellen wurden für die angegebenen Zeitintervalle mit TSH (50 mU/ml) oder zur Positivkontrolle für 10 min mit FCS (A, B, E, F: 50 %; C, D: 10 %) stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils einen Immunoblot für das phosphorylierte Protein ERK 1/2 (oben) sowie das totale Protein ERK 1/2 als Ladekontrolle (unten).

Sowohl bei FTC 133 wt TSH-R als auch bei HTC 238 Zellen wurde nach Applikation von TSH eine Zeit-abhängige Phosphorylierung von ERK 1/2 beobachtet (Abb. 5.2 A und B). In beiden Zelllinien war diese transient und erreichte ihr Maximum zehn Minuten nach der Stimulation. Die ML-1 Zellen (Abb. 5.2 C) reagierten im Vergleich zu FTC 133 wt TSH-R und HTC 238 Zellen deutlich schwächer auf den Stimulus TSH, zeigten jedoch eine schwache Zeit-abhängige Phosphorylierung von ERK 1/2 mit der gleichen Kinetik. In den drei Zelllinien CGTH-W-1, TT2609 C02 sowie RO82-W-1 zeigte der Antikörper gegen das phosphorylierte Protein ERK 1/2 dagegen keine bzw. eine kaum sichtbare Veränderung in den Intensitäten der einzelnen Banden vor und nach einer Stimulation mit TSH (Abb. 5.2 D, E und F). Bei den vier Zelllinien FTC 133 wt TSH-R, HTC 238, CGTH-W-1 sowie ML-1 führte die

Inkubation mit der Positivkontrolle FCS zu einer deutlichen Zunahme der Phosphorylierung des Proteins ERK 1/2. Dagegen konnte FCS bei TT2609 C02 und RO82-W-1 Zellen nur eine geringe zusätzliche Phosphorylierung induzieren. Die Ladekontrollen für das totale Protein ERK 1/2 waren in den meisten Fällen gleichmäßig, einzig bei der Positivkontrolle zeigte sich bei einigen Zelllinien ein schwächeres Bandenmuster als für die übrigen Proben. Das Ergebnis des durchgeführten Versuchs war, dass FTC 133 wt TSH-R, HTC 238 und ML-1 Zellen auf den Stimulus TSH mit einer Phosphorylierung von ERK 1/2 reagierten und daher offenbar funktionellen TSH-R exprimierten. Die Zelllinien CGTH-W-1, TT2609 C02 und RO82-W-1 exprimierten entweder keinen funktionellen TSH-R oder aktivierten nach dessen Stimulation nicht die ERK-Signalkaskade.

5.1.3 Analyse der TSH-abhängigen Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration in follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien

Da in dieser Arbeit von den G_s -unabhängigen Signalwegen des TSH-R insbesondere $G_{q/11}$ -abhängige Signalwege untersucht werden sollten, wurde auch deren Aktivierung in FTC 133 wt TSH-R sowie anderen humanen Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien funktionell analysiert. Nach einer Aktivierung von $G_{q/11}$ -Proteinen werden PLC-abhängig IP_3 -Moleküle gebildet, die durch die Aktivierung von IP_3 -Rezeptoren im endoplasmatischen Retikulum (ER) die intrazelluläre Calciumionenkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) erhöhen (siehe 3.2.2.3). Im Folgenden sollte daher mittels Fura-2 die $[Ca^{2+}]_i$ in FTC 133 wt TSH-R Zellen sowie drei weiteren Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien (HTC 238, ML-1 und RO82-W-1) nach Stimulation mit TSH bestimmt werden. Als Negativkontrolle wurde den Zellen Puffer (HBS) injiziert.

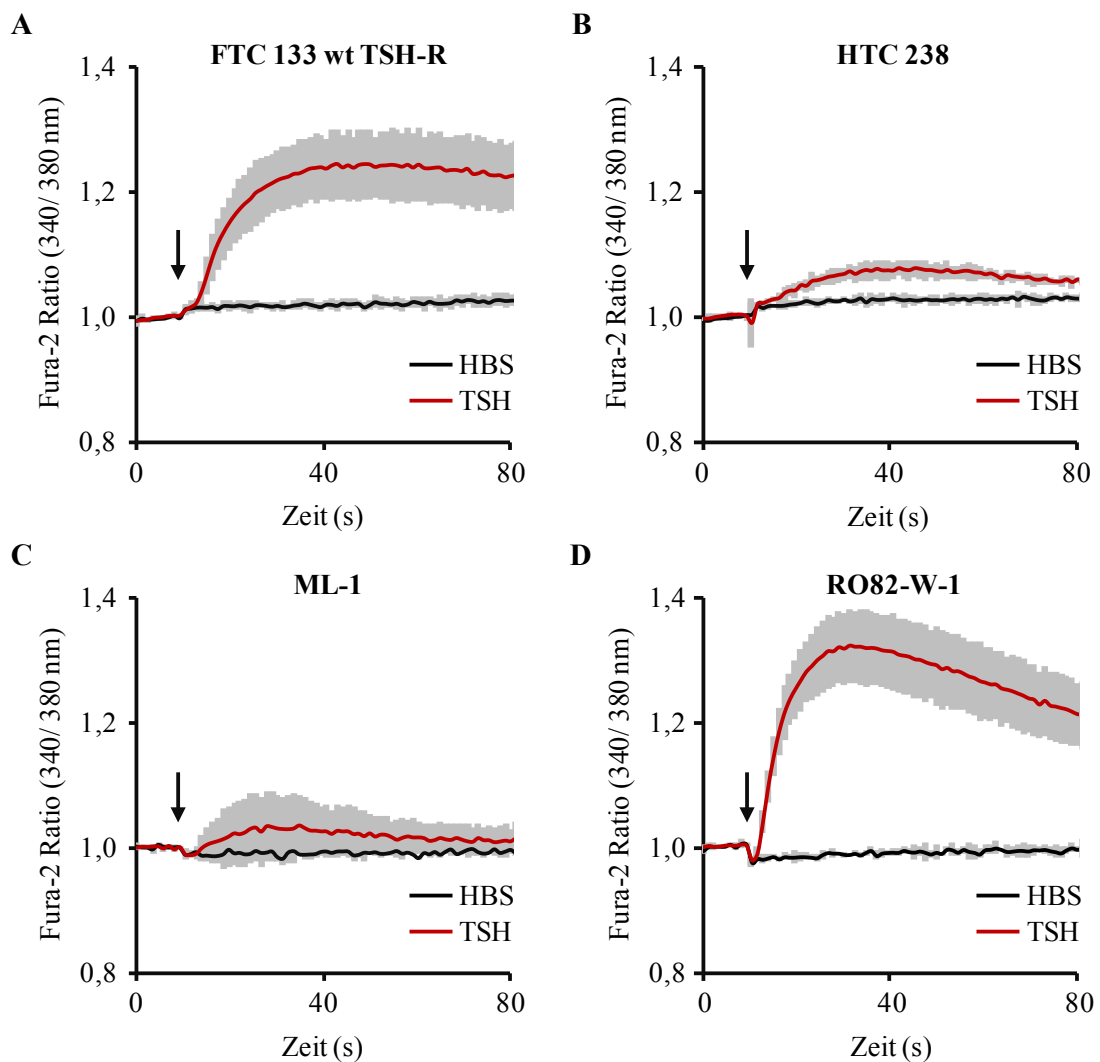


Abb. 5.3: Intrazelluläre Calciumionenkonzentration in follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien nach Stimulation mit TSH

Mit Fura-2 beladene (A) FTC 133 wt TSH-R, (B) HTC 238, (C) ML-1 und (D) RO82-W-1 Zellen wurden nach 10 s mit TSH (50 mU/ml) stimuliert, der Pfeil markiert die Injektion des Stimulus. Die Emission bei 510 nm wurde nach Anregung bei 340 nm und 380 nm alle 1,16 s bestimmt. Abgebildet ist der normierte Quotient der Emission der beiden Wellenlängen gegen die Zeit. Gemessen wurden je (A, C, D) 20.000 oder (B) 60.000 Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

Die FTC 133 wt TSH-R Zellen reagierten auf die Stimulation mit TSH unmittelbar mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ (Abb. 5.3 A). Der Spitzenwert der Calciumionenkonzentration wurde etwa 30 Sekunden nach der Applikation von TSH erreicht. Hier lag der Quotient der Emission bei 510 nm nach Anregung bei 340 nm und 380 nm bei etwa $1,24 \pm 0,06$. Es folgte eine Plateauphase, in der die $[Ca^{2+}]_i$ geringfügig abfiel. Nach insgesamt 80 Sekunden wurde die Messung beendet, zu diesem Zeitpunkt lag der Quotient bei etwa $1,23 \pm 0,05$. Da die TSH-Stimulation von 20.000 HTC 238 Zellen nicht zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ führte, wurde die Zellzahl erhöht, um die

Sensitivität des Versuchs zu steigern. Unter Verdreifachung der Zellzahl und Verwendung des ansonsten selben Protokolls reagierten die HTC 238 Zellen mit einer schwachen Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation mit TSH (Abb. 5.3 B). Die maximale Calciumionenkonzentration wurde etwa 35 Sekunden nach Injektion von TSH erreicht, der Quotient der Emission lag hier bei etwa $1,08 \pm 0,02$. Bei Beendigung der Messung lag der Quotient mit $1,06 \pm 0,01$ noch signifikant über dem der Negativkontrolle. Die ML-1 Zellen reagierten nur sehr schwach mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ auf den Stimulus TSH und unterschieden sich statistisch nicht von der HBS-Injektion (Abb. 5.3 C). Der höchste Quotient hatte den Wert $1,04 \pm 0,05$ und wurde etwa 25 Sekunden nach der Applikation von TSH erreicht. Die RO82-W-1 Zellen reagierten dagegen sofort und sehr deutlich auf die Stimulation mit TSH (Abb. 5.3 D). Bereits 19 Sekunden nach der Injektion erreichte die Kurve ihr Maximum, das bei $1,32 \pm 0,06$ lag. Im folgenden Zeitverlauf wurde die $[Ca^{2+}]_i$ wieder geringer. Bei Beendigung der Messung lag der Quotient der Fura-2 Signale bei $1,21 \pm 0,05$.

Zusammenfassend reagierten die Zelllinien FTC 133 wt TSH-R, HTC 238 und RO82-W-1 auf die Applikation von TSH mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$. Dies war ein Indiz für die Expression eines funktionellen TSH-R, der den $G_{q/11}$ -Signalweg aktivierte. Da die Kurven und somit die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ von FTC 133 wt TSH-R sowie RO82-W-1 Zellen deutlich über denen von HTC 238 und ML-1 Zellen lagen, schienen diese beiden Zelllinien besonders geeignet, um $G_{q/11}$ -abhängige Signalwege in follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien zu untersuchen.

5.2 TSH-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren besteht aus fünf miteinander verwandten Proteinen, wovon die vier Proteine NFATc1, NFATc2, NFATc3 und NFATc4 über die Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin reguliert werden (Loh et al. 1996). Calcineurin selbst wird durch eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ Calmodulin-abhängig aktiviert und kann so NFAT Proteine dephosphorylieren. Diese werden dadurch aktiviert und in den Zellkern transloziert, wo sie die Transkription verschiedener Zielgene initiieren (siehe 3.5).

NFAT Proteine spielen eine grundlegende Rolle im Immunsystem, werden aber fast ubiquitär exprimiert. Gegenwärtig zeichnet sich ab, dass auch in Tumorzellen funktionelles NFAT von Bedeutung ist (Mancini et al. 2009; Müller et al. 2010). Auch bei $G_{q/11}$ -regulierten Signalwegen des TSH-R könnte der Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle einnehmen. In den folgenden Versuchen sollte daher analysiert werden,

ob die TSH-abhängige Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT führen kann.

5.2.1 Expression der Calcineurin-abhängigen NFAT-Varianten auf mRNA-Ebene in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Um zu prüfen, ob der Transkriptionsfaktor NFAT an der $G_{q/11}$ -abhängigen Signaltransduktion des TSH-R beteiligt ist, wurde in FTC 133 wt TSH-R Zellen zuerst die generelle Expression der Calcineurin- und somit Calciumionen-abhängigen NFAT-Varianten auf mRNA-Ebene mit quantitativer PCR analysiert.

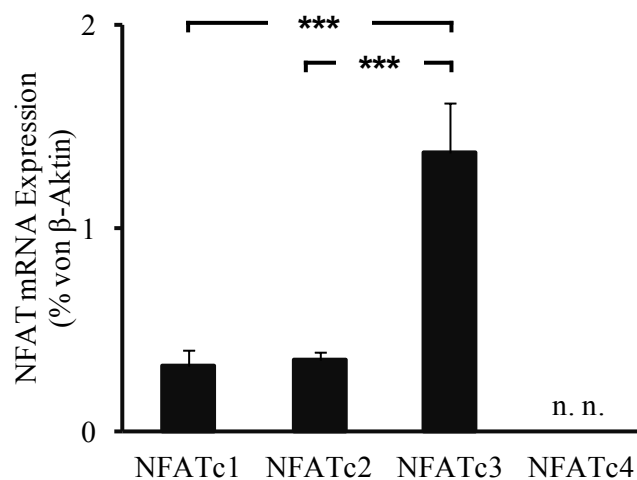


Abb. 5.4: mRNA-Expression der Calcium/Calcineurin-abhängigen NFAT-Varianten in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Die Expression der NFAT-Varianten NFATc1, NFATc2, NFATc3 und NFATc4 wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (***: $p < 0,001$). n. n.: nicht nachweisbar

Hierbei zeigte sich, dass in FTC 133 wt TSH-R Zellen NFATc1, NFATc2 und NFATc3 exprimiert wurden; NFATc4 mRNA konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 5.4). Die Expression von NFATc1 und NFATc2 unterschied sich nicht signifikant, sie lag bei 0,32 % \pm 0,08 bzw. 0,35 % \pm 0,04 bezogen auf β -Aktin. NFATc3 mRNA wurde mit 1,4 % \pm 0,24 bezogen auf β -Aktin dagegen stärker exprimiert. Trotz unterschiedlicher Expressionsstärken könnten NFATc1, NFATc2 und NFATc3 an einer Signaltransduktion beteiligt sein. Das Protein NFATc4 wurde nicht weiter untersucht, da keine mRNA nachweisbar war.

5.2.2 Expression der Calcineurin-abhängigen NFAT-Varianten auf Proteinebene in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Als nächstes sollte die Expression von NFATc1, NFATc2 und NFATc3 in FTC 133 wt TSH-R Zellen auf Proteinebene nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde eine Positivkontrolle für das jeweilige Protein aufgetragen. Im Fall der NFAT Antikörper –c1 und –c3 wurde dieses zusammen mit den Antikörpern bezogen, für NFATc2 wurde es aus der Pankreaskarzinom-Zelllinie PaTu 8988 T isoliert.

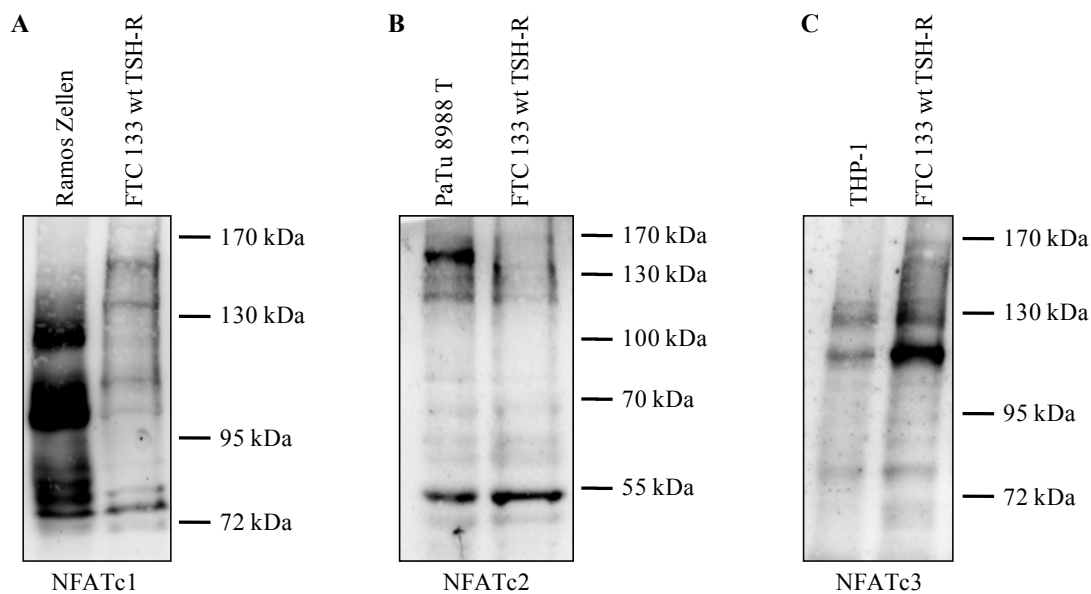


Abb. 5.5: Expression der Proteine NFATc1, NFATc2 und NFATc3 in FTC 133 wt TSH-R Zellen sowie in einer Positivkontrolle

Ganzzell-Lysate aus FTC 133 wt TSH-R Zellen sowie einer Positivkontrolle wurden mittels SDS-Page aufgetrennt und elektrochemisch auf Nitrocellulosemembran transferiert. (A) Immunoblot für NFATc1 mittels NFATc1 spezifischem Antikörper, Positivkontrolle (links) aus Ramos Ganzzell-Lysaten. (B) Immunoblot für NFATc2 mittels NFATc2 spezifischem Antikörper, Positivkontrolle (links) aus PaTu 8988 T Ganzzell-Lysaten. (C) Immunoblot für NFATc3 mittels NFATc3 spezifischem Antikörper, Positivkontrolle (links) aus THP-1 Ganzzell-Lysaten.

Mit dem NFATc1-spezifischen Antikörper wurden sowohl in FTC 133 wt TSH-R Zellen als auch im Lysat der Ramos Zellen (Positivkontrolle) im Bereich von etwa 75 bis 130 kDa mehrere Banden detektiert (Abb. 5.5 A). Diese waren in den FTC 133 wt TSH-R Zellen deutlich schwächer als in den Ramos Zellen, aber auf gleicher Höhe wie bei der Positivkontrolle. Offensichtlich wurde auch in der Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie das Protein NFATc1 exprimiert. Unter Verwendung des NFATc2-spezifischen Antikörpers (Abb. 5.5 B) wurden im Lysat der PaTu 8988 T Zellen (Positivkontrolle) zwei besonders prominente Banden sichtbar, eine bei 150 kDa, die andere bei 55 kDa. Im Bereich von 110 bis 170 kDa wurden zusätzlich drei schwächere Banden detektiert. Die Bande bei 55 kDa war vermutlich eine unspezifische

Bande, da das Protein NFATc2 laut Herstellerangaben auf einer Höhe von 120 kDa (unphosphoryliert) und 140 kDa (phosphoryliert) liegen sollte. Die prominente Bande bei 150 kDa entsprach dem phosphorylierten NFATc2 und auch die drei schwachen Banden waren vermutlich NFATc2 Protein. In den FTC 133 wt TSH-R Zellen waren diese vier Banden alle nur sehr schwach ausgeprägt. Die Expression des Proteins NFATc2 konnte aufgrund dieser kaum sichtbaren Banden nicht zweifelsfrei belegt werden. Der spezifische Antikörper gegen das Protein NFATc3 kann laut den Herstellerangaben alle sechs Isoformen bei etwa 80 bis 130 kDa erkennen. In diesem Größenbereich wurden im Lysat der THP-1 Zellen (Positivkontrolle) zwei distinkte Banden detektiert, die auf spezifisches NFATc3 Protein hinwiesen (Abb. 5.5 C). Auf gleicher Höhe wurden in den FTC 133 wt TSH-R Zellen zwei Banden nachgewiesen, die sogar deutlich stärker waren als in den THP-1 Zellen. Demnach wurde in den FTC 133 wt TSH-R Zellen das Protein NFATc3 exprimiert. Die Immunoblots bestätigten also die auf mRNA-Ebene beobachtete Expression der Proteine NFATc1 und NFATc3 in FTC 133 wt TSH-R Zellen, zum Protein NFATc2 konnte an dieser Stelle keine eindeutige Aussage getroffen werden..

5.2.3 Subzelluläre Lokalisation endogener NFAT Proteine in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Nach dem Nachweis einer NFATc1 und NFATc3 Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen sollte nun deren Aktivität vor und nach einer Stimulation mit TSH untersucht werden. Dafür wurde mit Hilfe immunzytochemischer Aufnahmen die subzelluläre Lokalisation der NFAT Proteine bestimmt, denn nur dephosphoryliertes und somit aktives NFAT kann in den Zellkern transloziert werden. Als Positivkontrolle sollte die Stimulation mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin dienen. Im Rahmen der immunzytochemischen Aufnahmen sollte außerdem die mögliche Expression des Proteins NFATc2 in FTC 133 wt TSH-R Zellen weiterführend analysiert werden. Im Fall einer Expression von NFATc2 wurde gleichzeitig die subzelluläre Lokalisation des Proteins bestimmt.

Beim immunzytochemischen Nachweis, in dem der spezifische Antikörper gegen NFATc1 eingesetzt wurde, war das Fluoreszenzsignal hauptsächlich im Kern sichtbar, im Zytoplasma war das Signal deutlich schwächer (Abb. 5.6 A). Die vorhandene Immunreaktivität durch den spezifischen Antikörper gegen NFATc2 legte eine Expression des Proteins in FTC 133 wt TSH-R Zellen nahe (Abb. 5.6 B). Dabei war im Zytoplasma unstimulierter FTC 133 wt TSH-R Zellen nur wenig Fluoreszenzsignal vorhanden, in der dargestellten Aufnahme konnte dort in zwei von drei Zellen keine Immunmarkierung nachgewiesen werden. Im Zellkern waren die Signale dagegen

sehr deutlich, wobei auffiel, dass die Kernkörperchen (Nucleoli) nicht angefärbt waren. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass NFATc1 und NFATc2 in unstimulierten FTC 133 wt TSH-R Zellen im Zellkern lokalisiert waren. Da sich nur aktivierte NFAT-Proteine im Zellkern befinden, wäre eine TSH-abhängige Aktivierung nicht mehr möglich.

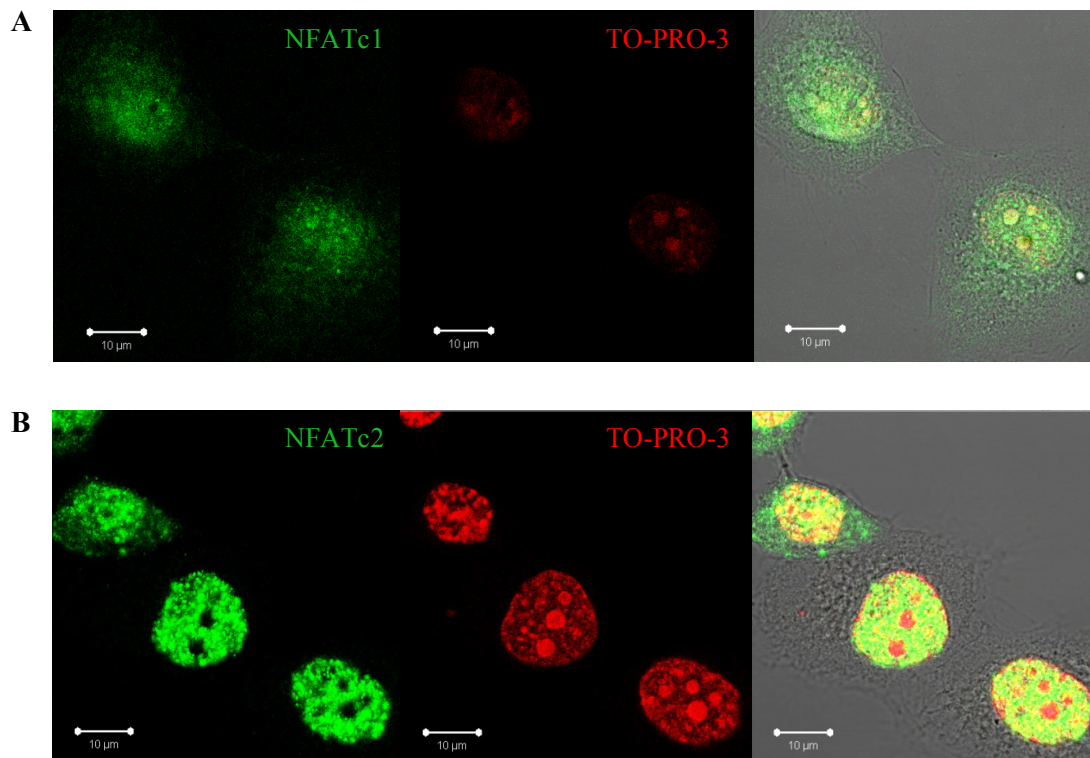


Abb. 5.6: Subzelluläre Lokalisation von NFATc1 und NFATc2 in unstimulierten FTC 133 wt TSH-R Zellen

Immunocytochemischer Nachweis der Proteine (A) NFATc1 (grün) sowie (B) NFATc2 (grün) in unstimulierten FTC 133 wt TSH-R Zellen. Zur Gegenfärbung wurden die Zellkerne mit TO-PRO-3 (rot) angefärbt. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen.

Im Folgenden wurden die NFATc1 und NFATc2 Proteine mit diesen Antikörpern daher nicht weiter analysiert und stattdessen wurde das NFATc3 Protein näher charakterisiert.

Im Gegensatz zu NFATc1 und NFATc2 zeigte die Immunfärbung mit dem NFATc3-spezifischen Antikörper in unstimulierten FTC 133 wt TSH-R Zellen eine Markierung im Zytoplasma, während im Zellkern keine Immunreaktivität nachgewiesen wurde (Abb. 5.7). Demzufolge könnte NFATc3 durch TSH aktiviert werden. Die Stimulation mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin konnte die Lokalisation des Fluoreszenzsignals nach 10-, 30- und 60-minütiger Inkubation jedoch nicht verändern. Da die Stimulation der Zellen mit Ionomycin (Positivkontrolle) keine Veränderung in

Ergebnisse

der Immunreaktivität des spezifischen NFATc3-Antikörpers zeigte, wurde ein anderer Ansatz gewählt, um eine potenzielle TSH-abhängige NFAT-Aktivierung zu untersuchen.

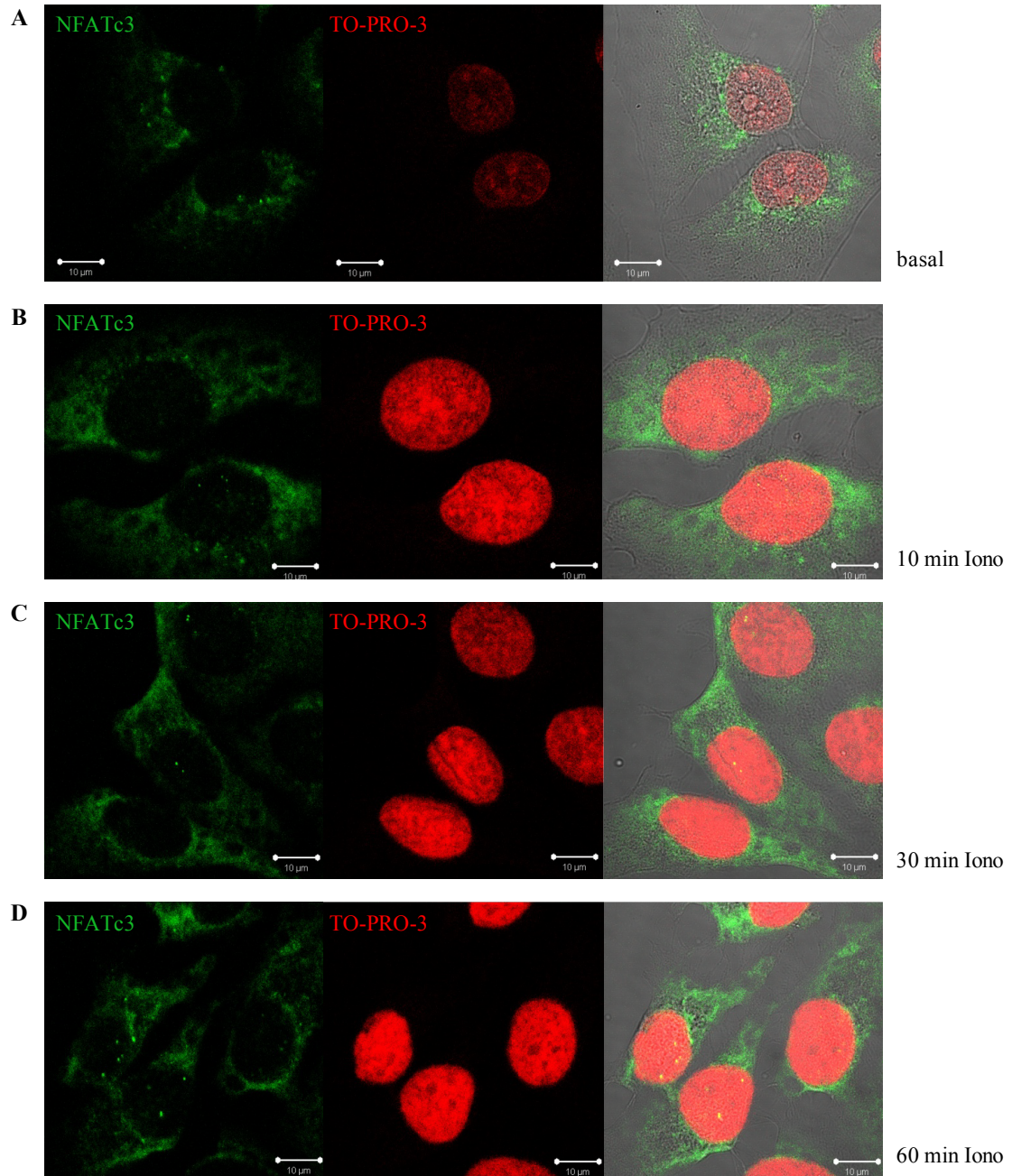


Abb. 5.7: Subzelluläre Lokalisation von NFATc3 in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit Ionomycin

Immunzytochemischer Nachweis des Proteins NFATc3 (grün) in FTC 133 wt TSH-R Zellen. (A) Unstimulierte Zellen. (B) Zellen wurden für 10 min mit Ionomycin (Iono, 0,4 µM) stimuliert. (C) Zellen wurden für 30 min mit Iono (0,4 µM) stimuliert. (D) Zellen wurden für 60 min mit Iono (0,4 µM) stimuliert. Zur Gegenfärbung wurden die Zellkerne mit TO-PRO-3 (rot) angefärbt. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen.

5.2.4 Subzelluläre Lokalisation des NFATc3-eGFP Fusionsproteins nach TSH-Stimulation in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Zur Aufklärung einer möglichen TSH-abhängigen NFAT-Aktivierung in follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien sollte die subzelluläre Lokalisation der NFAT Proteine mit Hilfe von NFAT-eGFP Fusionsproteinen ermittelt werden. Diese Methode bietet aufgrund der Überexpression von NFAT zum einen den Vorteil einer erhöhten Sensitivität. Zum anderen kann durch die direkte Fluoreszenz-Markierung die subzelluläre Lokalisation *in vitro* über einen gewünschten Zeitraum in Echtzeit beobachtet werden. Da sowohl NFATc1 als auch NFATc2 bereits in unstimulierten FTC 133 wt TSH-R Zellen im Zellkern lokalisiert waren und so keine TSH-vermittelte Aktivierung mehr möglich ist, wurde das NFATc3-eGFP Fusionsprotein für die im Folgenden vorgestellten Analysen zur subzellulären Lokalisation von NFAT ausgewählt. Dazu wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen 24 Stunden vor ihrer Messung mit dem NFATc3-eGFP DNA-Konstrukt transfiziert und anschließend im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Zellen wurden mit TSH stimuliert und über einen Zeitraum von einer Stunde wurde alle fünf Sekunden die subzelluläre Lokalisation des Fusionsproteins dokumentiert. Außerdem wurden die Zellen mit dem Calcium-Ionophor A23187 inkubiert. Diese Stimulation sollte als Positivkontrolle für den Versuchsaufbau dienen.

Das NFATc3-eGFP Fusionsprotein wurde in unstimulierten FTC 133 wt TSH-R Zellen ($t = 0$ min) nahezu ausschließlich im Zytoplasma detektiert (Abb. 5.8, $t = 0$ min). Nach der Stimulation mit dem Calcium-Ionophor A23187 (Abb. 5.8 A) änderte sich dessen subzelluläre Lokalisation, hier nahm die Fluoreszenz im Laufe der Zeit immer mehr zu, während sie im Zytoplasma immer schwächer wurde. Nach 30 Minuten befand sich in diesen Zellen in Kern und Zytoplasma ungefähr gleich viel Protein pro Flächeneinheit, nach 60 Minuten war deutlich mehr Protein im Zellkern als im Zytoplasma vorhanden. Jedoch reagierten nicht alle Zellen auf A23187, in vielen gemessenen Zellen änderte sich die subzelluläre Lokalisation des NFATc3-eGFP Proteins nicht (Abb. 5.8 A). Nach der Stimulation mit TSH (Abb. 5.8 B) kam es in wenigen gemessenen Zellen zu einer sehr schwachen Zunahme der Fluoreszenz im Zellkern, die auf eine TSH-abhängige Kerntranslokation des NFATc3-eGFP Proteins hindeutete. Da aber TSH-vermittelt in keiner FTC 133 wt TSH-R Zelle eine eindeutige Verschiebung der Fluoreszenz vom Zytoplasma hin zum Zellkern festgestellt werden konnte, waren weitere, unabhängige Analysen notwendig, um eine TSH-abhängige NFAT-Aktivierung eindeutig zu beweisen.

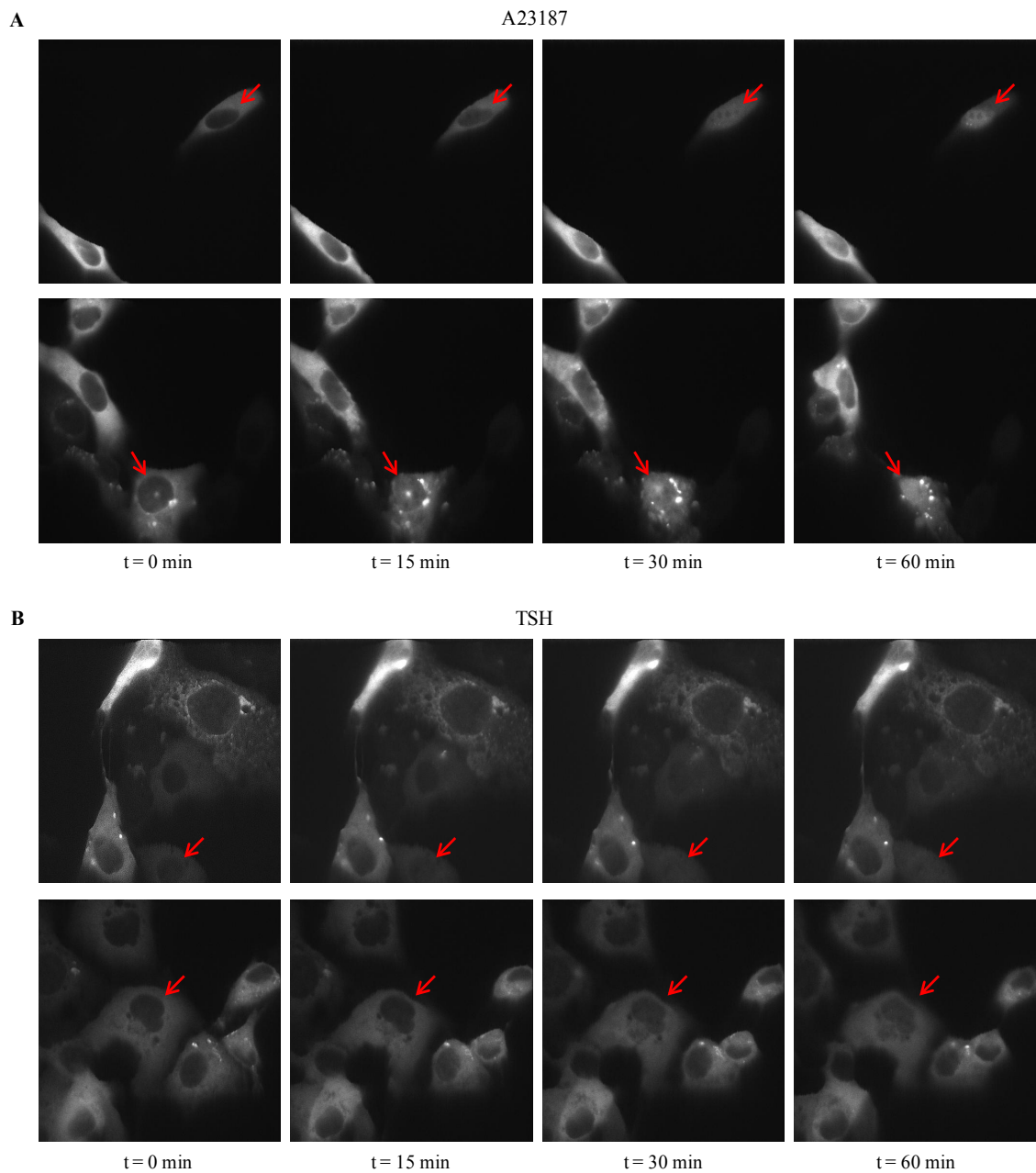


Abb. 5.8: Subzelluläre Lokalisation des NFATc3-eGFP Fusionsproteins in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit A23187 oder TSH

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden mit einem NFATc3-eGFP DNA-Konstrukt transfiziert und 24 h später mit (A) A23187 (10 μ M) oder (B) TSH (50 mU/ml) stimuliert. Die Emission bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm wurde über einen Zeitraum von 1 h alle 5 s mit Hilfe eines Polychrom V Monochromators und einer Digitalkamera, die mit einem invertierten Mikroskop verbunden waren, dokumentiert. Zellkerne, deren Fluoreszenz während der Stimulation zunahm, sind mit einem Pfeil markiert. Dargestellt sind Aufnahmen desselben Sichtfelds unmittelbar bevor ($t = 0$ min) sowie 15; 30 und 60 min nach der Stimulation.

5.2.5 TSH-induzierte Expression eines NFAT-abhängigen Reporter-genkonstrukts in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Im Folgenden wurde ein NFAT-abhängiges Reporter-genkonstrukt verwendet, um die TSH-induzierte Aktivierung von NFAT in FTC 133 wt TSH-R Zellen zu analysieren. Dieses modifizierte Gen enthielt in der Promoterregion ein NFAT-responsibles Element, dessen Besetzung die Transkription des Reportergens Firefly-Luciferase initiierte.

Bei der durchgeführten NFAT-Reporter-genstudie wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen 48 Stunden vor ihrer Stimulation mit dem NFAT-Reporter-genkonstrukt sowie (zur Normierung der Transfektionseffizienz) einem konstitutiv exprimierten *Renilla*-Luciferase Reporter-gen transfiziert. Die Stimulation mit TSH oder, als Positivkontrolle für den Versuchsaufbau, mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin erfolgte über einen Zeitraum von 6 Stunden. Um zu überprüfen, ob eine potenzielle Reporter-genaktivität durch die Calcineurin-abhängigen NFAT-Varianten induziert wurde, wurden die Zellen in einem parallelen Ansatz 30 Minuten vor und während der gesamten Stimulation mit dem Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A (CsA) inkubiert.

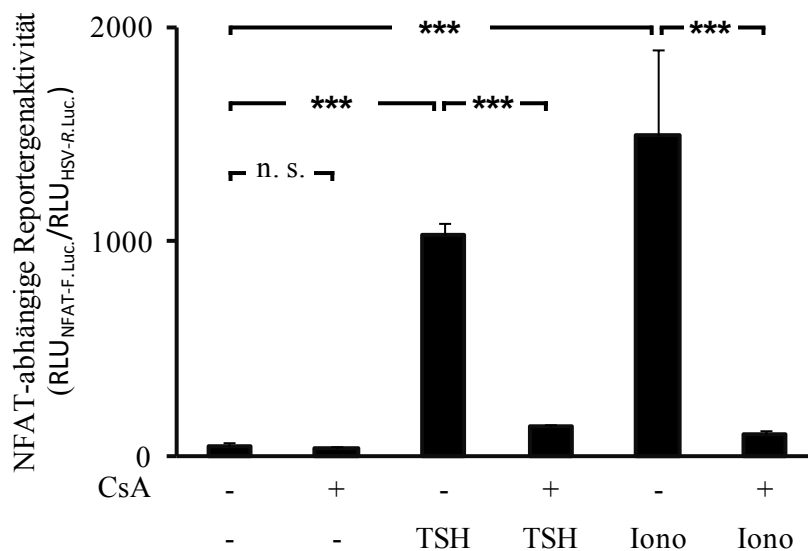


Abb. 5.9: NFAT-abhängige Reporter-genaktivität in FTC 133 wt TSH-R Zellen

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden mit einem NFAT-induzierbaren Firefly-Luciferase-Konstrukt sowie einem konstitutiv exprimierten *Renilla*-Luciferase-Konstrukt transfiziert, 48 h später für 30 min mit dem Inhibitor Cyclosporin A (CsA, 1 μ M) vorinkubiert und anschließend für 6 h mit TSH (50 mU/ml) oder Ionomycin (Iono, 0,4 μ M) stimuliert. Zur Bestimmung der NFAT-abhängigen Reporter-genaktivität wurde die Summe der relativen Lichteinheiten der NFAT-abhängigen Firefly-Luciferase (RLU_{NFAT-F.Luc.}) auf den Mittelwert der relativen Lichteinheiten der konstitutiv exprimierten *Renilla*-Luciferase (RLU_{HSV-R.Luc.}) normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (***: $p < 0,001$; n. s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)).

Die Stimulation mit TSH führte in FTC 133 wt TSH-R Zellen zu einer deutlichen Steigerung der NFAT-abhängigen Reporterogenaktivität (Abb. 5.9). Im Vergleich zu unstimulierten Zellen war diese signifikant um fast das 20-fache erhöht. Der Calcineurin-Inhibitor CsA konnte diese Induktion signifikant hemmen. Unter seiner Behandlung erreichte die Reporterogenaktivität bei gleichzeitiger TSH-Stimulation nur etwa das 2,7-fache des Basalwertes. Der Inhibitor alleine hatte dagegen keinen signifikanten Einfluss auf den Basalwert. Auch die Positivkontrolle Ionomycin konnte den Transkriptionsfaktor NFAT aktivieren. Unter ihrer Behandlung wurde die 28-fache Reporterogenaktivität von unstimulierten Zellen erreicht. Diese Zunahme konnte ebenfalls durch CsA signifikant inhibiert werden: hier lag die Reporterogenaktivität etwa beim 1,9-fachen des Basalwertes.

Mit Hilfe des NFAT-abhängigen Reportergenkonstrukts konnte also gezeigt werden, dass in der Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie FTC 133 wt TSH-R nach Stimulation des TSH-R der Transkriptionsfaktor NFAT aktiviert wurde. Die physiologische Relevanz dieser Aktivierung sollte im Anschluss über die Ermittlung NFAT-abhängiger Zielgene näher charakterisiert werden.

5.3 TSH-induzierte Expression NFAT-abhängiger Zielgene in follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien

Über eine NFAT-abhängige Expression von Zielgenen, die im Immunsystem eine Rolle spielen (z. B. Interleukin 2 und 4 sowie Interferone), reguliert der Transkriptionsfaktor sowohl die T-Zell-Aktivierung und Differenzierung als auch die Funktion anderer Immunzellen. Es gibt aber auch eine Reihe von Zielgenen, die außerhalb des Immunsystems exprimiert werden und die beim follikulären Schilddrüsenkarzinom eine wichtige Rolle spielen könnten. Dazu gehören Autotaxin, VEGF c-Myc, RCAN1 und Cox-2, deren Expression nach TSH-Stimulation daher im Folgenden analysiert wurde.

5.3.1 TSH-induzierte Autotaxin Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Als erstes sollte in diesem Zusammenhang die TSH-abhängige Expression von Autotaxin untersucht werden. Auch als ENPP2 (Ectonukleotid Pyrophosphatase/Phosphodiesterase Familienmitglied 2) bezeichnet, ist Autotaxin in Brustkrebszellen als NFAT-abhängiges Zielgen beschrieben (Chen et al. 2005). Indem es die Migration von Tumorzellen fördert, könnte es auch in Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien als NFAT-abhängiges Zielgen eine interessante Rolle spielen. Daher wurden die Expression von

Autotaxin mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach einer Stimulation mit TSH quantitativ ausgewertet.

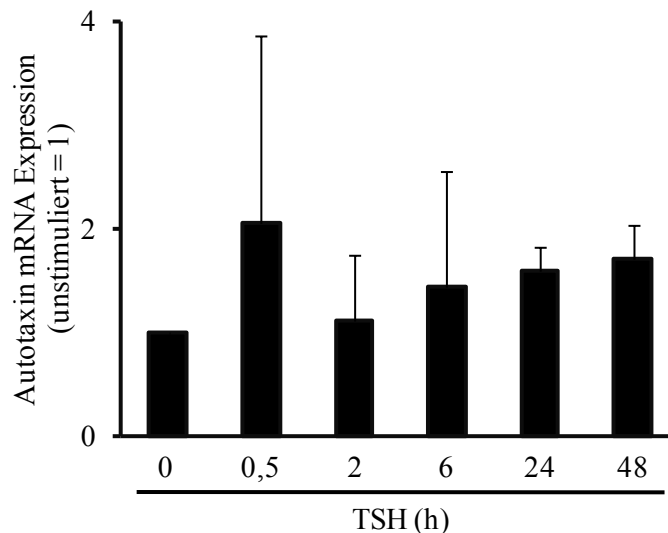


Abb. 5.10: Expression von Autotaxin mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit TSH

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 0; 0,5; 2; 6; 24; oder 48 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. Die Expression von Autotaxin wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt und auf den Basalwert der Zellen normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

Nach einer Inkubation mit TSH wurde die Expression der Autotaxin mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nur wenig verändert (Abb. 5.10). Die maximale Induktion durch TSH wurde nach 0,5 Stunden erreicht, hier lag die 2,1-fache mRNA Menge von unbehandelten Zellen vor. Aufgrund der geringen Effekte wurde die TSH-abhängige Autotaxin Expression nicht weiter analysiert.

5.3.2 TSH-induzierte VEGF Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) spielt in Karzinomen sowohl bei der Angiogenese als auch bei der Migration oft eine wichtige Rolle. Er ist selbst als Aktivator von NFAT beschrieben, doch er kann auch durch aktives NFAT induziert werden (Dong et al. 2013). Daher wurde die Expression der drei VEGF-Isoformen VEGF-A, VEGF-B und VEGF-C in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach einer Stimulation mit TSH untersucht.

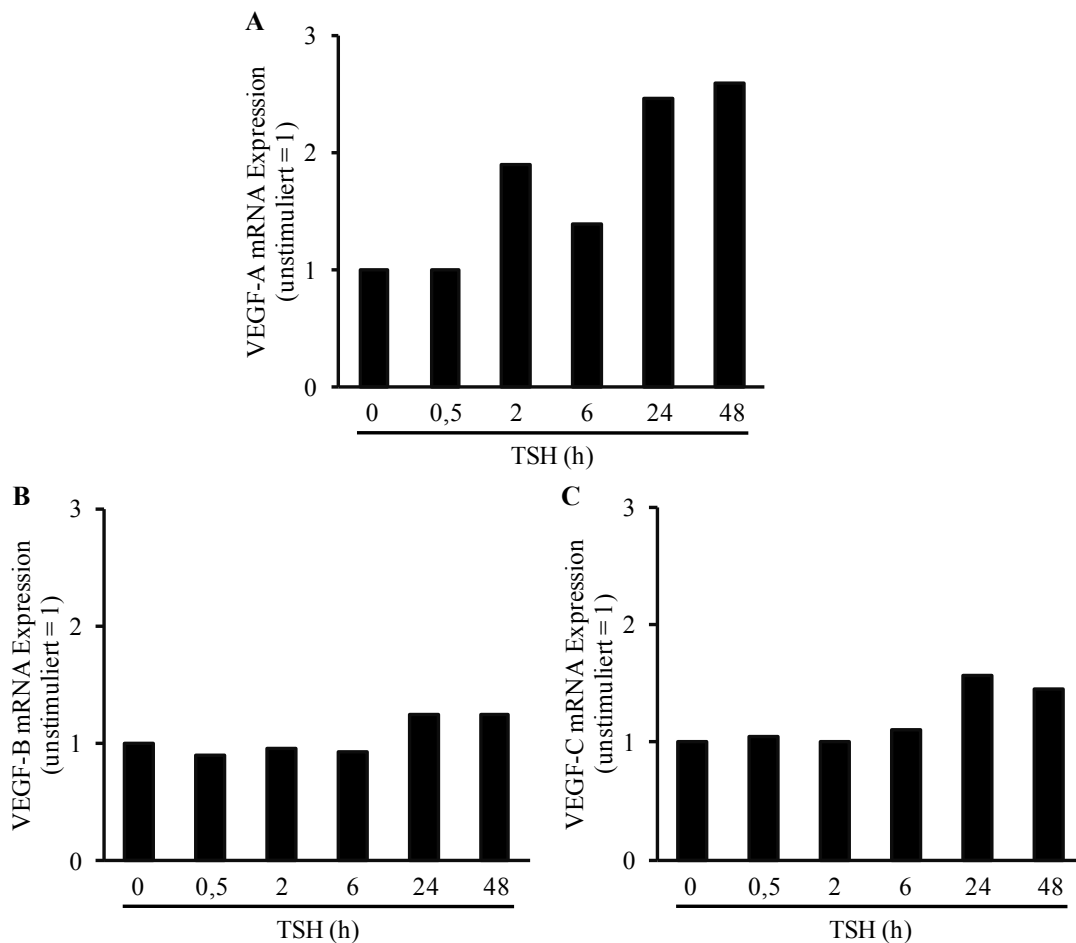


Abb. 5.11: Expression von VEGF-A, -B und -C mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit TSH

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 0; 0,5; 2; 6; 24; oder 48 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. Die Expression von (A) VEGF-A, (B) VEGF-B und (C) VEGF-C wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt und auf den Basalwert der Zellen normiert. Dargestellt sind die Werte eines Experiments.

Die drei untersuchten VEGF-Isoformen reagierten unterschiedlich auf TSH. Während die Expression der VEGF-A mRNA (Abb. 5.11 A) nach einer Inkubation für 24 und 48 Stunden um etwa das 2,5-fache gesteigert wurde, war die Expression von VEGF-B (Abb. 5.11 B) und VEGF-C (Abb. 5.11 C) in allen beobachteten Stimulationszeiträumen nur wenig gegenüber dem Basalwert verändert. Da es sich um Einzelversuche handelte, müssen weitere unabhängige Experimente dieses Ergebnis bestätigen.

5.3.3 TSH-induzierte c-Myc Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Als nächstes sollte die TSH-abhängige Expression von c-Myc untersucht werden. Das Proto-Onkogen ist bereits als TSH-abhängiges Zielgen beschrieben (Dere

et al. 1985) und kann direkt durch NFATc1 induziert werden (Buchholz et al. 2006). Daher wurde überprüft, ob die mRNA-Expression von c-Myc in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach einer Stimulation mit TSH gesteigert wird.

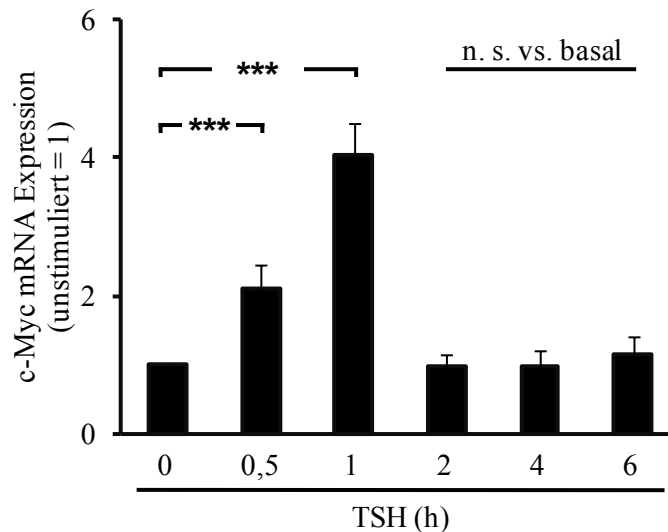


Abb. 5.12: Expression von c-Myc mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit TSH
 FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 0; 0,5; 1; 2; 4; oder 6 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. Die Expression von c-Myc wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt und auf den Basalwert der Zellen normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (***: $p < 0,001$; n. s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)).

Die Inkubation der FTC 133 wt TSH-R Zellen mit TSH führte zu einem Zeit-abhängigen Anstieg der c-Myc mRNA-Expression, wobei die meiste mRNA eine Stunde nach der Stimulation vorhanden war (Abb. 5.12). Gegenüber dem Basalwert war die Expression hier um etwa das 4-fache erhöht. Zwei Stunden nach der Stimulation konnte gegenüber dem Basalwert keine signifikante Veränderung in der c-Myc mRNA-Expression mehr beobachtet werden.

5.3.3.1 Analyse einer Calcineurin/NFAT-Aktivierung bei der TSH-induzierten c-Myc Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Nachdem gezeigt worden war, dass in FTC 133 wt TSH-R Zellen die Expression von c-Myc mRNA durch TSH gesteigert wird, sollte eine Beteiligung von NFAT bei dieser Induktion überprüft werden. Dazu wurden die Zellen vor und während der TSH-Stimulation mit dem Calcineurin-Inhibitor CsA inkubiert. Da die NFAT-Aktivierung von Calcineurin abhängig ist, sollte auch eine NFAT-vermittelte c-Myc Expression durch CsA inhibierbar sein.

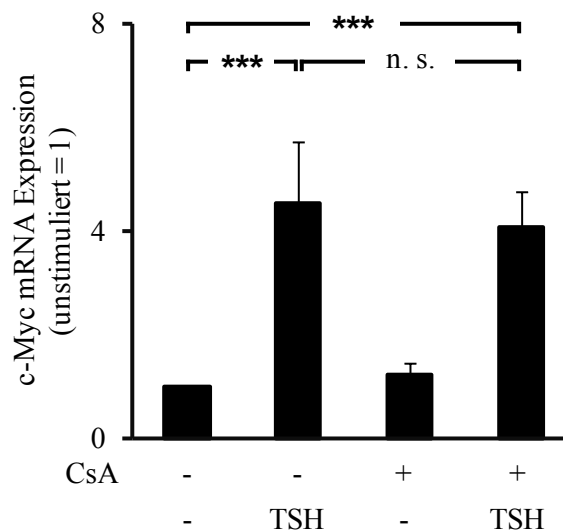


Abb. 5.13: Expression von c-Myc mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition von Calcineurin und Stimulation mit TSH

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 30 min mit dem Inhibitor Cyclosporin A (CsA, 1 μ M) vorinkubiert und anschließend für 1 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. Die Expression von c-Myc wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt und auf den Basalwert der Zellen normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (***: $p < 0,001$; n. s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)).

Die Vorinkubation mit CsA führte in FTC 133 wt TSH-R Zellen zu keiner signifikanten Verringerung der TSH-induzierten c-Myc mRNA-Expression (Abb. 5.13). Da die generelle Wirksamkeit von CsA bereits in der durchgeführten NFAT-Reporter-genstudie demonstriert worden war (siehe Abb. 5.9), wurde die Induktion von c-Myc nicht über den Transkriptionsfaktor NFAT, sondern über einen anderen Signalweg reguliert.

5.3.3.2 Analyse einer MAPK-Aktivierung bei der TSH-induzierten c-Myc Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Auch über die Signalkaskade der Mitogen-aktivierten Proteinkinase ERK 1/2 kann die Expression von c-Myc induziert werden. Die Aktivierung dieses Signalwegs wurde in dieser Arbeit bereits für FTC 133 wt TSH-R Zellen gezeigt (siehe Abb. 5.2 A). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die TSH-abhängige c-Myc Expression darauf zurückzuführen ist. Da direkte ERK 1/2-Inhibitoren kommerziell nicht erhältlich sind, wurde die Signaltransduktionskaskade eine Ebene höher unterbrochen, indem die Aktivierung von ERK 1/2 durch den MEK-Inhibitor U0126 blockiert wurde. Dafür wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen mit U0126 vorinkubiert und anschließend mit TSH stimuliert.

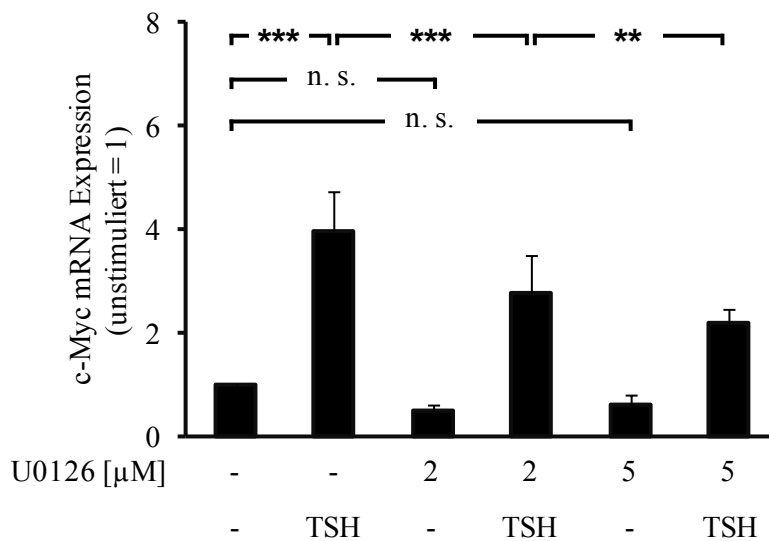


Abb. 5.14: Expression von c-Myc mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition von MEK und Stimulation mit TSH

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 30 min mit dem Inhibitor U0126 (2 oder 5 μ M) vorinkubiert und anschließend für 1 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. Die Expression von c-Myc wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt und auf den Basalwert der Zellen normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (**: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; n. s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)).

Die Inhibition mit U0126 konnte die TSH-vermittelte Expression von c-Myc mRNA Konzentrations-abhängig signifikant reduzieren, aber nicht vollständig unterdrücken (Abb. 5.14). Bei der Behandlung mit 2 μ M U0126 wurde die c-Myc mRNA-Expression von dem 4-fachen auf das 2,8-fache gesenkt, 5 μ M U0126 konnten die TSH-induzierte c-Myc Expression auf das 2,2-fache mindern. Auf den Basalwert hatte die Inkubation mit den zwei verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors keinen signifikanten Einfluss. Die Ergebnisse zeigten, dass die Signalkaskade der Mitogen-aktivierten Proteinkinase ERK 1/2 an der mRNA-Induktion von c-Myc beteiligt war.

5.3.4 TSH-induzierte RCAN1 Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen

5.3.4.1 TSH-induzierte Expression von RCAN1 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Der Regulator von Calcineurin 1 (RCAN1, auch bekannt als Down Syndrome Candidate Region 1, DSCR1) wird durch NFAT induziert und ist in follikulären Schilddrüsenkarzinomzellen bereits als Inhibitor der Zellmigration beschrieben (Espinosa et al. 2009). Um zu analysieren, ob RCAN1 ein TSH-reguliertes und NFAT-abhängiges Zielgen in FTC 133 wt TSH-R Zellen sein könnte, wurden diese für

verschiedene Zeiträume mit TSH stimuliert und die synthetisierte RCAN1 mRNA mittels spezifischen Primern quantifiziert.

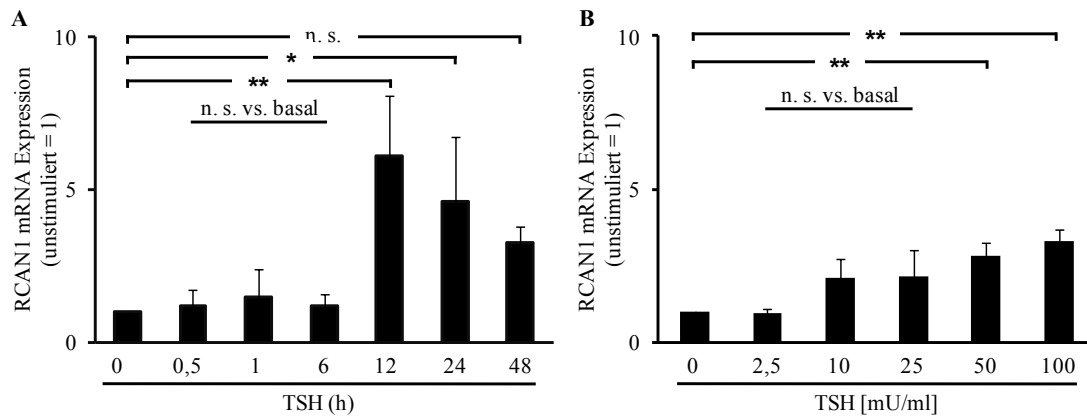


Abb. 5.15: Expression von RCAN1 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit TSH
 (A) FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 0; 0,5; 1; 6; 12; 24 oder 48 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert.
 (B) FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 12 h mit TSH (0; 2,5; 10; 25; 50 oder 100 mU/ml) stimuliert.
 Die Expression von RCAN1 wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt und auf den Basalwert der Zellen normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; n. s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)).

In FTC 133 wt TSH-R Zellen führte die Inkubation mit TSH zu einer Zeit-abhängigen Expressionssteigerung der RCAN1 mRNA (Abb. 5.15 A). Bei den kürzeren Stimulationszeiträumen von bis zu sechs Stunden war die Expression der RCAN1 mRNA im Vergleich zu unstimulierten Zellen nicht signifikant verändert. Erst nach 12 Stunden war diese signifikant erhöht. Hier lag etwa die 6-fache Menge der basal vorhandenen mRNA Menge vor. Im weiteren Zeitverlauf wurde die vorhandene RCAN1 mRNA wieder weniger, war aber nach 24 Stunden im Vergleich zu unstimulierten Zellen noch signifikant erhöht. Die beobachtete Induktion von RCAN1 mRNA war außerdem abhängig von der TSH-Konzentration (Abb. 5.15 B). Bei 10 und 25 mU/ml TSH lag die mRNA-Expression etwa beim 2-fachen des Basalwertes. Dieser war allerdings nicht signifikant verändert. Erst TSH-Konzentrationen von 50 und 100 mU/ml konnten eine signifikante Anreicherung von RCAN1 mRNA erwirken, in diesem Versuchsansatz allerdings nur um das 2,8- bzw. 3,3-fache von basal.

5.3.4.2 TSH-induzierte mRNA-Expression der RCAN1-Isoformen RCAN1.1 und RCAN1.4 in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Als nächstes sollte die durch TSH gesteigerte Expression von RCAN1 näher charakterisiert werden. RCAN1 existiert aufgrund alternativer Startexons in mehreren Isoformen, wovon RCAN1.1 und RCAN1.4 die beiden Haupt-Isoformen sind. Sie wer-

den unterschiedlich reguliert und nur die Expression von RCAN1.4 kann durch NFAT induziert werden (siehe 3.5.5.2). Um die Möglichkeit einer NFAT-Abhängigkeit bei der TSH-induzierten RCAN1 Expression zu überprüfen, wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen mit TSH stimuliert und anschließend die Expression der beiden Isoformen RCAN1.1 und RCAN1.4 mit Hilfe spezifischer Primer separat analysiert.

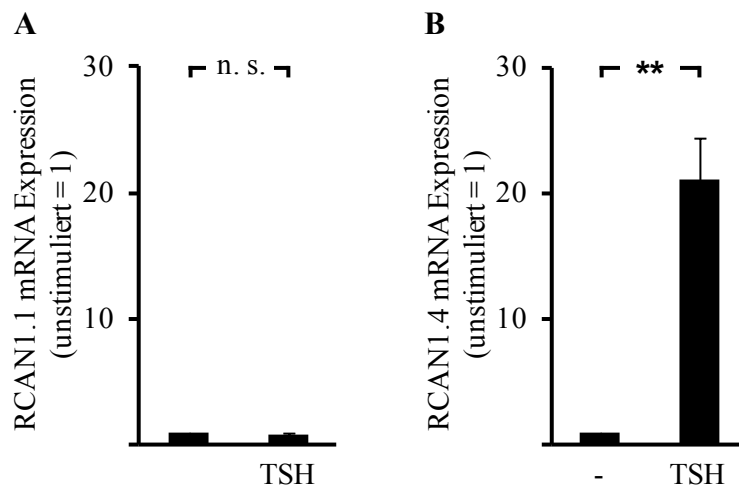


Abb. 5.16: Expression von RCAN1.1 und RCAN1.4 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit TSH

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 12 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. Die Expression der RCAN1-Isoformen (A) RCAN1.1 und (B) RCAN1.4 wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt und auf den Basalwert der Zellen normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels „Student’s t-test“ für verbundene Stichproben (**: $p < 0,01$; n. s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)).

Die Stimulation mit TSH wirkte sich auf die beiden RCAN1-Isoformen unterschiedlich aus. Während die Expression von RCAN1.1 nicht signifikant verändert wurde (Abb. 5.16 A), konnte TSH die Expression von RCAN1.4 signifikant um mehr als das 20-fache von unstimulierten Zellen steigern (Abb. 5.16 B). Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass die TSH-abhängige RCAN1 Induktion in FTC 133 wt TSH-R Zellen durch NFAT vermittelt wird.

5.3.4.3 TSH-induzierte Expression des Proteins RCAN1 in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Nach der dargestellten Induktion der RCAN1 mRNA bzw. der RCAN1-Isoform RCAN1.4 durch TSH sollte auch die Expression des Proteins RCAN1 in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach einer Stimulation mit TSH analysiert werden.

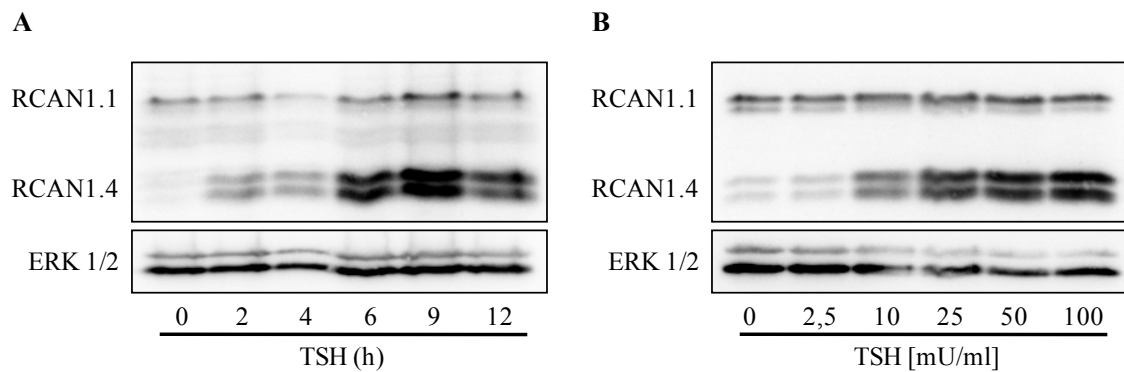


Abb. 5.17: Expression des Proteins RCAN1 in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit TSH

(A) FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 0; 2; 4; 6; 9 oder 12 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. (B) FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 12 h mit den angegebenen TSH-Konzentrationen stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils einen Immunoblot für das Protein RCAN1 (oben) sowie das totale Protein ERK 1/2 als Ladekontrolle (unten).

Die Expression des Proteins RCAN1.4 wurde durch den Stimulus TSH sowohl Zeit- (Abb. 5.17 A) als auch Konzentrations-abhängig (Abb. 5.17 B) erhöht, während für RCAN1.1 keine Intensitätszunahme der einzelnen Banden beobachtet wurde. Bereits zwei Stunden nach der Inkubation mit TSH war mehr RCAN1.4 vorhanden als bei unstimulierten Zellen. Die Expression nahm bei längerer Stimulation deutlich sichtbar zu und erreichte ihr Maximum neun Stunden nach der TSH-Applikation. Auch nach 12-stündiger Inkubation mit dem Stimulus exprimierten die FTC 133 wt TSH-R Zellen noch deutlich mehr RCAN1.4 als unter basalen Bedingungen. Bei der Stimulation mit verschiedenen TSH-Konzentrationen zeigte sich bei 2,5 mU/ml noch keine erhöhte Expression des Proteins RCAN1.4. Die Konzentration mit 10 mU/ml war jedoch bereits ausreichend, um eine gesteigerte Expression gegenüber basal zu beobachten und höhere Konzentrationen führten zu einer noch höheren Proteinexpression von RCAN1.4.

5.3.4.4 Analyse einer Calcineurin/NFAT-Aktivierung bei der TSH-induzierten RCAN1 Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Einfluss von Calcineurin-Inhibitoren auf die TSH-induzierte RCAN1 Expression

Nachdem gezeigt worden war, dass in FTC 133 wt TSH-R Zellen ausschließlich die Expression der RCAN1-Isoform RCAN1.4 durch TSH gesteigert wird, sollte die Abhängigkeit von Calcineurin/NFAT noch in einem zusätzlichen Versuchsansatz bestätigt werden. Die Einbindung von Calcineurin in der TSH-vermittelte RCAN1 Expression wurde daher mit Hilfe der beiden direkten Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A (CsA) und Tacrolimus (FK 506) auf mRNA- sowie Protein-Ebene näher untersucht.

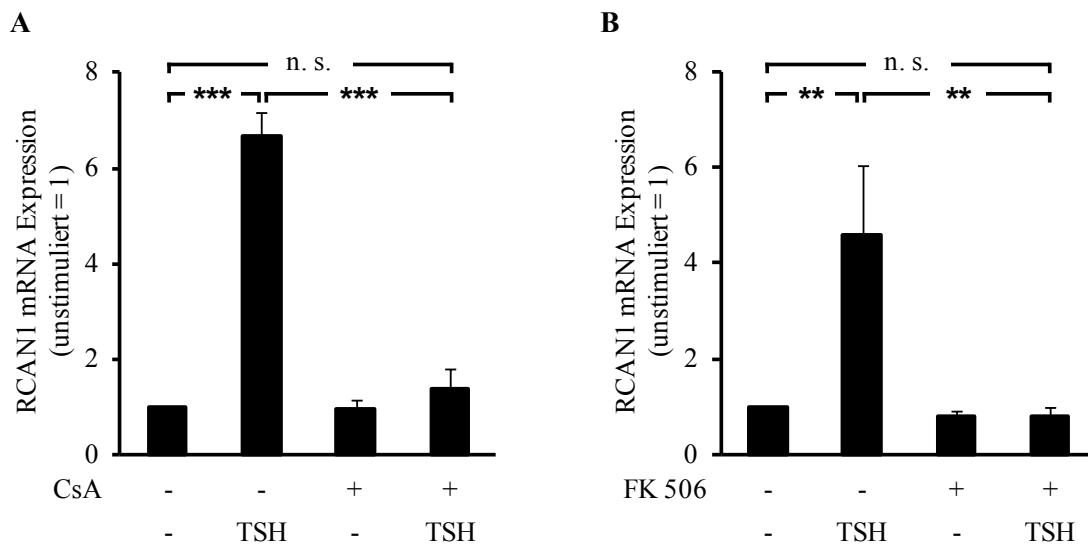


Abb. 5.18: Expression von RCAN1 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition von Calcineurin und Stimulation mit TSH

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 30 min mit (A) dem Inhibitor Cyclosporin A (CsA, 1 μ M) oder (B) dem Inhibitor Tacrolimus (FK 506, 50 nM) vorinkubiert und anschließend für 12 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. Die Expression von RCAN1 wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt und auf den Basalwert der Zellen normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (**: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; n. s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)).

Die TSH-vermittelte Expression der RCAN1 mRNA konnte durch beide Calcineurin-Inhibitoren signifikant inhibiert werden und nach ihrer Vorinkubation konnte eine folgende Stimulation mit TSH die Expression von RCAN1 mRNA nicht mehr signifikant steigern (Abb. 5.18). CsA senkte die TSH-vermittelte RCAN1 mRNA-Expression von dem 6,7-fachen des Basalwertes auf das 1,4-fache, während eine Behandlung mit FK 506 die RCAN1 mRNA-Expression von dem 4,6-fachen auf das 1,4-fache reduzierte. Die Inkubation mit den Inhibitoren alleine führte zu keiner signifikanten Veränderung gegenüber der basalen RCAN1 mRNA-Expression.

Im Immunoblot konnte das für die RCAN1 mRNA gezeigte Ergebnis auf Proteinebene reproduziert werden. Die Inkubation mit TSH führte zu einer deutlichen Expressionssteigerung von RCAN1.4, bei vorheriger Inkubation mit CsA oder FK 506 wurde diese jedoch komplett geblockt (Abb. 5.19).

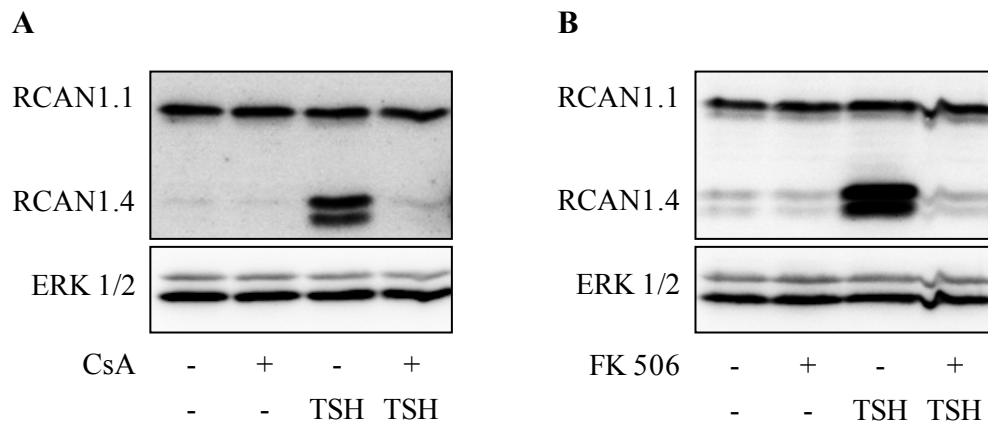


Abb. 5.19: Expression des Proteins RCAN1 in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition von Calcineurin und Stimulation mit TSH

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 30 min mit (A) dem Inhibitor Cyclosporin A (CsA, 1 μ M) oder (B) dem Inhibitor Tacrolimus (FK 506, 50 nM) vorinkubiert und anschließend für 12 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. Die Abbildungen zeigen einen Immunoblot für das Protein RCAN1 (oben) sowie das totale Protein ERK 1/2 als Ladekontrolle (unten).

Die Untersuchungen mit den Calcineurin-Inhibitoren bestätigten somit, dass die TSH-induzierte RCAN1 Expression abhängig von der Phosphatase Calcineurin war.

Einfluss von INCA-6 auf die TSH-induzierte RCAN1 Expression

Um sicherzugehen, dass nach einer Aktivierung von Calcineurin auch der Transkriptionsfaktor NFAT an der TSH-vermittelten RCAN1 Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen beteiligt ist, wurde die Expression außerdem unter Vorinkubation mit dem Inhibitor INCA-6 analysiert. Dieser hemmt spezifisch die Interaktion zwischen Calcineurin und NFAT, indem er die Substrat-Erkennungsstelle blockiert und gilt somit als selektiver und potenter NFAT-Signalweg-Inhibitor.

Die Vorinkubation mit INCA-6 führte bei Stimulation mit TSH zu einer verringerten Expression sowohl von RCAN1 mRNA (Abb. 5.20 A) als auch des Proteins RCAN1.4 (Abb. 5.20 B). Während die alleinige Stimulation mit TSH die Menge der nachgewiesenen RCAN1 mRNA um mehr als das 4-fache erhöhte, wurde bei gleichzeitiger Behandlung mit INCA-6 nicht einmal das 1,5-fache erreicht. Auch die erhöhte Expression des Proteins RCAN1.4 wurde nahezu komplett durch INCA-6 inhibiert. Damit galt ein funktionaler Zusammenhang zwischen der TSH-induzierten Expression von RCAN1 mit dem Transkriptionsfaktor NFAT als gesichert.

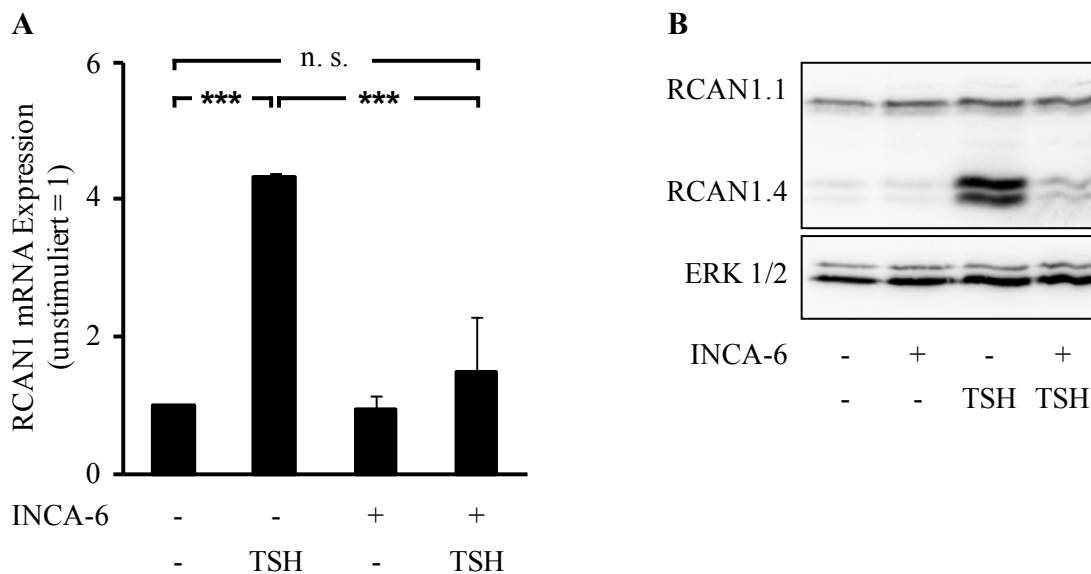


Abb. 5.20: Expression von RCAN1 mRNA und Protein in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition von NFAT und Stimulation mit TSH

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 30 min mit dem Inhibitor INCA-6 (5 μ M) vorinkubiert und anschließend für 12 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. (A) Die Expression von RCAN1 mRNA wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt und auf den Basalwert der Zellen normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (***: $p < 0,001$; n. s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)). (B) Die Abbildungen zeigen einen Immunoblot für das Protein RCAN1 (oben) sowie das totale Protein ERK 1/2 als Ladekontrolle (unten).

5.3.4.5 Rolle der G-Protein-Aktivierung bei der TSH-induzierten RCAN1 Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Als nächstes sollte der Signalweg von der Aktivierung des TSH-R bis zur NFAT-Aktivierung und letztendlichen RCAN1 Expression näher charakterisiert werden. Dazu wurde eine mögliche Beteiligung einzelner Signalmoleküle nach der Aktivierung des TSH-R untersucht und zuerst analysiert, welche G-Proteine für die beobachtete RCAN1 Induktion essenziell sind.

Einfluss von G_s -Proteinen auf die TSH-induzierte RCAN1 Expression

Da die meisten molekularen Ziele des TSH-R G_s - und somit cAMP-abhängig reguliert werden, wurde zuerst eine Beteiligung dieses Signalwegs an der TSH-vermittelten RCAN1 Expression untersucht. Wie unter 5.1 beschrieben, kann Forskolin (FSK) Adenylcyclasen (AC) aktivieren und so die Bildung von cAMP initiieren. Wenn die TSH-induzierte RCAN1 Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen über das G-Protein G_s und cAMP stattfinden würde, sollte auch Forskolin die Expression von RCAN1 steigern können.

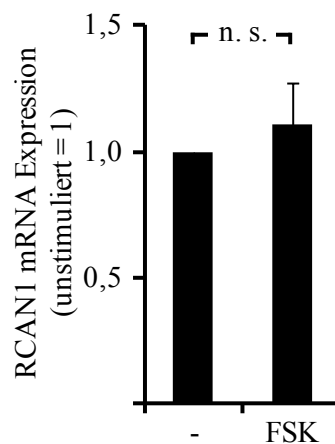


Abb. 5.21: Expression von RCAN1 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit Forskolin

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 12 h mit Forskolin (FSK, 10 μ M) stimuliert. Die Expression von RCAN1 wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt und auf den Basalwert der Zellen normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels „Student’s t-test“ für verbundene Stichproben (n. s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)).

Die Stimulation von FTC 133 wt TSH-R Zellen mit FSK konnte die Expression von RCAN1 mRNA nicht beeinflussen (Abb. 5.21). Im Vergleich zu unstimulierten Zellen gab es keine signifikante Veränderung in der Menge der quantifizierten RCAN1 mRNA. Dieses Ergebnis zeigte jedoch nur, dass cAMP alleine nicht ausreichend war, um die Expression von RCAN1 zu steigern. Es konnte jedoch, in Kombination mit einem anderen TSH-aktivierten Signalweg, an der RCAN1 Induktion beteiligt sein. Um diese Möglichkeit zu analysieren, wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen mit dem cAMP-Analogon Rp-cAMPS inkubiert, das die cAMP-vermittelte Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) kompetitiv inhibiert, und anschließend mit TSH oder Forskolin stimuliert.

Der Inhibitor Rp-cAMPS hatte keinen Einfluss auf die TSH-abhängige RCAN1 Expression (Abb. 5.22). Außerdem konnte FSK auch auf Proteinebene keine Erhöhung der Expression von RCAN1 bewirken. Eine Beteiligung von G_s -vermittelten Signalwegen bei der TSH-induzierten RCAN1 Expression erschien daher unwahrscheinlich.

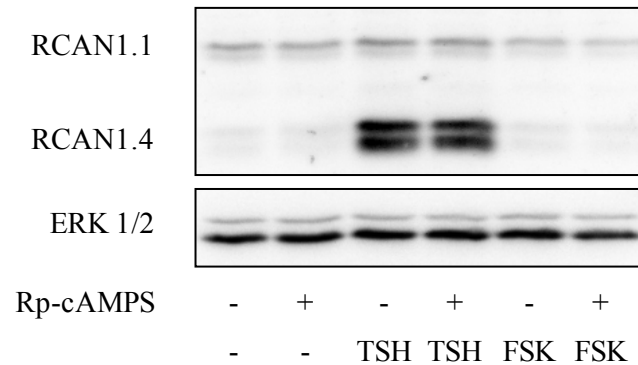


Abb. 5.22: Expression des Proteins RCAN1 in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition der Proteinkinase A und Stimulation mit TSH oder Forskolin

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 30 min mit dem Inhibitor Rp-cAMPS (20 μ M) vorinkubiert und anschließend für 12 h mit TSH (50 mU/ml) oder Forskolin (FSK, 10 μ M) stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils einen Immunoblot für das Protein RCAN1 (oben) sowie das totale Protein ERK 1/2 als Ladekontrolle (unten).

Einfluss von G_i -Proteinen auf die TSH-induzierte RCAN1 Expression

Um eine Beteiligung von G_i -Proteinen in der TSH-vermittelten RCAN1 Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen zu analysieren, wurden diese mit Pertussis Toxin (PTX) inkubiert, das selektiv die α -Untereinheiten von G_i -Proteinen inhibiert. PTX wird von dem Bakterium *Bordetella pertussis*, dem Erreger des Keuchhustens, produziert.

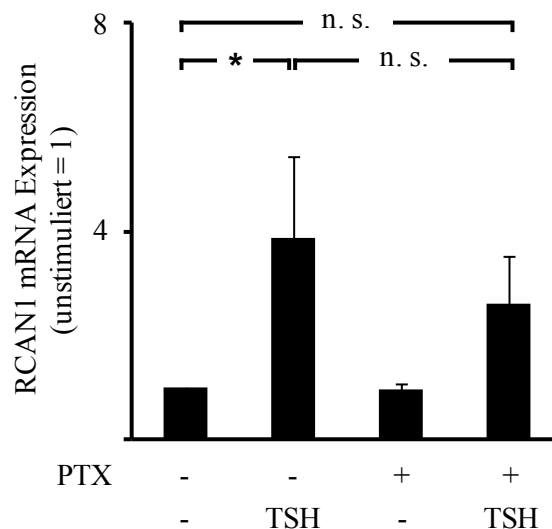


Abb. 5.23: Expression von RCAN1 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition von G_i -Proteinen und Stimulation mit TSH

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 18 h mit dem Inhibitor Pertussis Toxin (PTX, 100 ng/ml) vorinkubiert und anschließend für 12 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. Die Expression von RCAN1 wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt und auf den Basalwert der Zellen normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (*: $p < 0,05$; n. s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)).

Die Behandlung mit PTX konnte die TSH-vermittelte RCAN1 Expression, die beim 3,9-fachen von unstimulierten Zellen lag, auf das 2,6-fache reduzieren (Abb. 5.23). Allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant.

Der bei der mRNA-Expression beobachtete Effekt sollte auf Proteinebene näher charakterisiert werden. Zusätzlich zur Stimulation mit TSH wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen mit Thapsigargin (TG) stimuliert, einem Inhibitor der Ca^{2+} -ATPasen im Sarko- und Endoplasmatischen Retikulum (SERCA). Die Inhibition dieser ATPasen führt zu einer langsamen Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und damit unabhängig von G-Proteinen zu einer Aktivierung von NFAT.

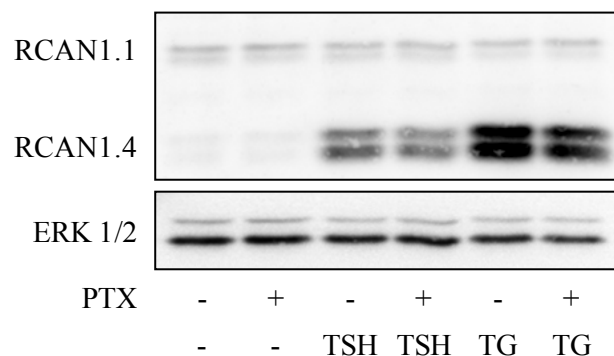


Abb. 5.24: Expression des Proteins RCAN1 in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition von G_i -Proteinen und Stimulation mit TSH oder Thapsigargin

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 18 h mit dem Inhibitor Pertussis Toxin (PTX, 100 ng/ml) vorinkubiert und anschließend für 12 h mit TSH (50 mU/ml) oder Thapsigargin (TG, 0,4 μM) stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils einen Immunoblot für das Protein RCAN1 (oben) sowie das totale Protein ERK 1/2 als Ladekontrolle (unten).

Die Vorinkubation mit PTX führte auch auf Proteinebene zu einer Hemmung der TSH-induzierten Expression von RCAN1, denn die Proteinbande der zusätzlich mit PTX behandelten FTC 133 wt TSH-R Zellen war weniger intensiv als die der nur mit TSH stimulierten Zellen (Abb. 5.24). Ein ähnlicher Effekt zeigte sich bei der Behandlung der Zellen mit TG. Da TG jedoch unabhängig von G-Proteinen die Proteinexpression von RCAN1 induziert, konnte die beobachtete verminderte Proteinexpression durch PTX nicht durch die Inhibition von G_i erklärt werden. PTX hatte in FTC 133 wt TSH-R Zellen vermutlich einen unspezifischen toxischen Effekt auf die *de novo* Proteinbiosynthese. Auf bereits synthetisierte Proteine hatte PTX jedoch keinen negativen Effekt, denn die Ladekontrolle zeigte keine PTX-bedingten Unterschiede in der Expression des Proteins ERK 1/2.

Aufgrund dieses Ergebnisses konnte ein funktionaler Zusammenhang zwischen der Aktivierung von G_i -Proteinen und der TSH-vermittelten RCAN1 Expression nahezu ausgeschlossen werden.

Einfluss von $G_{q/11}$ -Proteinen auf die TSH-induzierte RCAN1 Expression

Im Folgenden sollte die Einbeziehung von $G_{q/11}$ -Proteinen bei der TSH-induzierten Expression von RCAN1 analysiert werden. Da es keine kommerziell erhältlichen Inhibitoren gegen $G_{q/11}$ -Proteine gibt, sollte die Expression der α -Untereinheiten mit Hilfe von spezifischen siRNAs herunterreguliert werden. Um die am besten funktionierende siRNA auszuwählen, musste sowohl die Effizienz als auch die Spezifität der verschiedenen siRNAs zuerst überprüft werden. Dazu wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen mit jeweils einer von zwei verschiedenen siRNAs gegen G_{α_q} oder $G_{\alpha_{11}}$ oder mit einer Kontroll-siRNA transfiziert und die Expression von G_{α_q} sowie $G_{\alpha_{11}}$ mRNA 72 Stunden später quantifiziert.

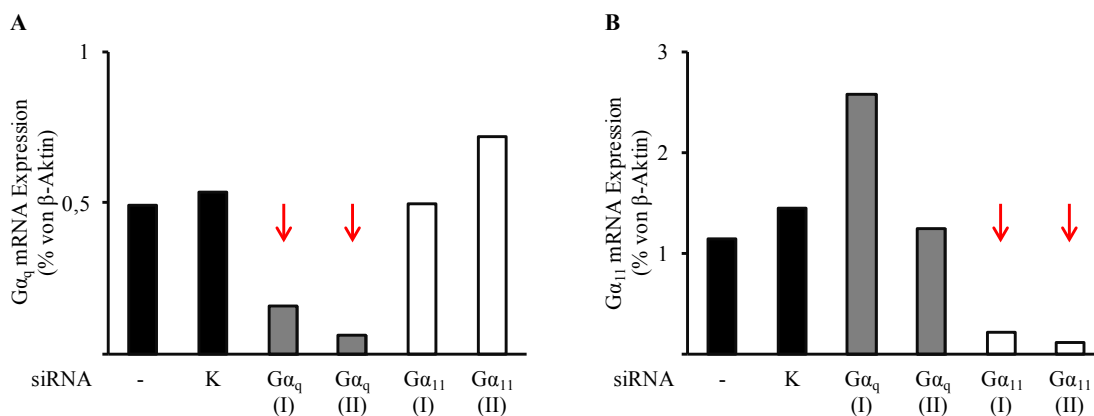


Abb. 5.25: Expression von G_{α_q} und $G_{\alpha_{11}}$ mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen G_{α_q} oder $G_{\alpha_{11}}$

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden mit Kontroll-siRNA (K) oder einer von zwei verschiedenen siRNAs (I bzw. II) gegen G_{α_q} oder $G_{\alpha_{11}}$ transfiziert und 72 h inkubiert. Die Expression von (A) G_{α_q} und (B) $G_{\alpha_{11}}$ wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt. Dargestellt sind die Werte aus einem Experiment. Die herunterregulierte mRNA ist mit einem roten Pfeil markiert.

Die Kontroll-siRNA hatte keinen inhibitorischen Einfluss auf die mRNA-Expression von G_{α_q} und $G_{\alpha_{11}}$ (Abb. 5.25). Da in nachfolgenden Experimenten Zellen, die mit siRNA gegen G_{α_q} oder $G_{\alpha_{11}}$ transfiziert worden waren, mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen verglichen werden, wurde der Effekt der spezifischen siRNAs ausschließlich mit dem von Kontroll-siRNA transfizierten Zellen verglichen. Dabei konnten beide siRNAs gegen G_{α_q} (G_{α_q} (I) und G_{α_q} (II)) die Expression von G_{α_q} reduzieren, wobei die siRNA G_{α_q} (II) effizienter war (Abb. 5.25 A). Diese senkte die G_{α_q} mRNA-Expression von 0,56 % auf 0,06 % bezogen auf β -Aktin. Somit wurde die Expression der G_{α_q} mRNA um 88 % herunterreguliert. Nach Transfektion mit der G_{α_q} siRNA (I) wurden dagegen noch 0,16 % G_{α_q} mRNA bezogen auf β -Aktin exprimiert, die Effizienz lag hier bei 70 %. Die Expression der $G_{\alpha_{11}}$ mRNA wurde durch die siRNA G_{α_q} (I) gegenüber Kontroll-siRNA transfizierten Zellen um das 1,8-fache

gesteigert, die siRNA $G\alpha_q$ (II) hatte dagegen fast keinen Einfluss auf die $G\alpha_{11}$ mRNA-Expression (Abb. 5.25 B). Zur Herunterregulation von $G\alpha_q$ wurde daher im Folgenden ausschließlich die $G\alpha_q$ siRNA (II) verwendet. Die siRNAs $G\alpha_{11}$ (I) und $G\alpha_{11}$ (II) waren beide gegen die $G\alpha_{11}$ mRNA gerichtet und konnten diese Expression gegenüber Kontroll-siRNA transfizierten FTC 133 wt TSH-R Zellen von 1,45 % auf 0,22 % bzw. 0,12 % bezogen auf β -Aktin herabsetzen (Abb. 5.25 B). Damit wurden die $G\alpha_{11}$ mRNA-Expression nach einer $G\alpha_{11}$ siRNA (I) Transfektion um 84 % und nach einer $G\alpha_{11}$ siRNA (II) Transfektion um 92 % inhibiert. Auf die Expression der $G\alpha_q$ mRNA nahmen die beiden siRNAs gegen $G\alpha_{11}$ nur wenig Einfluss, nach ihrer Transfektion wurde die 0,9- bzw. 1,3-fache $G\alpha_q$ mRNA-Menge im Vergleich zu Kontroll-siRNA transfizierten Zellen quantifiziert (Abb. 5.25 A). Da die $G\alpha_{11}$ siRNA (II) die Expression von $G\alpha_{11}$ effizienter herunterreguliert hatte, wurde sie für alle folgenden Versuche ausgewählt.

Als nächstes sollte analysiert werden, welchen Effekt die Herunterregulation der $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ mRNA auf die TSH-vermittelte RCAN1 Induktion einnimmt. Dazu wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen mit Kontroll-siRNA, $G\alpha_q$ oder $G\alpha_{11}$ siRNA transfiziert und anschließend mit TSH stimuliert.

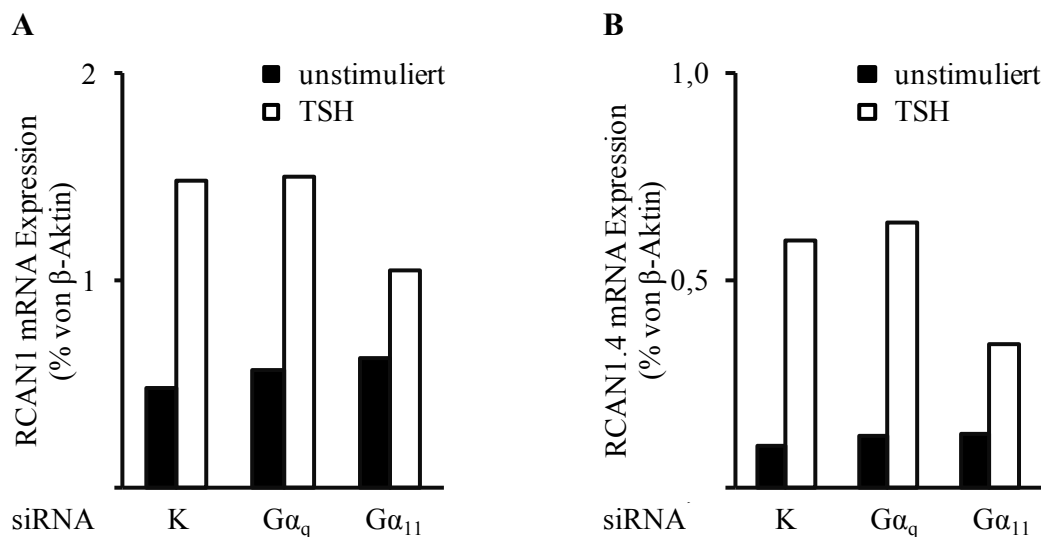


Abb. 5.26: Expression von RCAN1 und RCAN1.4 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen $G\alpha_q$ oder $G\alpha_{11}$ und Stimulation mit TSH

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden mit Kontroll-siRNA (K) oder siRNA gegen $G\alpha_q$ oder $G\alpha_{11}$ transfiziert und 57 h später für 15 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. Die Expression von (A) RCAN1 und (B) RCAN1.4 wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt. Dargestellt sind die Werte aus einem Experiment.

Die Transfektion mit siRNA gegen $G\alpha_q$ hatte in FTC 133 wt TSH-R Zellen im Vergleich zu Kontroll-siRNA transfizierten Zellen fast keinen Einfluss auf die TSH-induzierte Expression sowohl von RCAN1 als auch von RCAN1.4 mRNA (Abb. 5.26). Während nach einer TSH-Stimulation von Kontroll-siRNA transfizierten Zellen die 3,1- bzw. 6-fache Menge mRNA von unstimulierten Zellen quantifiziert wurde, führte die Stimulation von FTC 133 wt TSH-R Zellen, die mit siRNA gegen $G\alpha_q$ transfiziert worden waren, zu einer 2,6- bzw. 5,1-fachen RCAN1 und RCAN1.4 mRNA-Expression im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Die Expression von RCAN1 und RCAN1.4 nach einer Transfektion mit siRNA gegen $G\alpha_{11}$ war nach der Stimulation mit TSH vermindert, hier wurde die 1,7- bzw. 2,6-fache RCAN1 bzw. RCAN1.4 mRNA Menge von unstimulierten Zellen nachgewiesen. Da diese Ergebnisse aus einem einzigen Experiment stammten, konnte an dieser Stelle keine endgültige Aussage über die G-Protein Abhängigkeit von $G\alpha_q$ oder $G\alpha_{11}$ alleine getroffen werden.

Da $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ zur gleichen G-Protein Familie gehören und daher sehr ähnlich sind, könnte nach der Herunterregulation eines dieser Proteine das jeweils andere die Signalübertragung für die TSH-vermittelte RCAN1 Induktion übernehmen. Um diese Möglichkeit näher zu charakterisieren, sollten die G-Proteine $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ gleichzeitig herunterreguliert werden. Dazu wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen sowohl mit $G\alpha_q$ als auch mit $G\alpha_{11}$ siRNA transfiziert. Als Referenz wurden sie mit der gleichen Menge Kontroll-siRNA transfiziert, die dem doppelten einer singulären Transfektion entsprach.

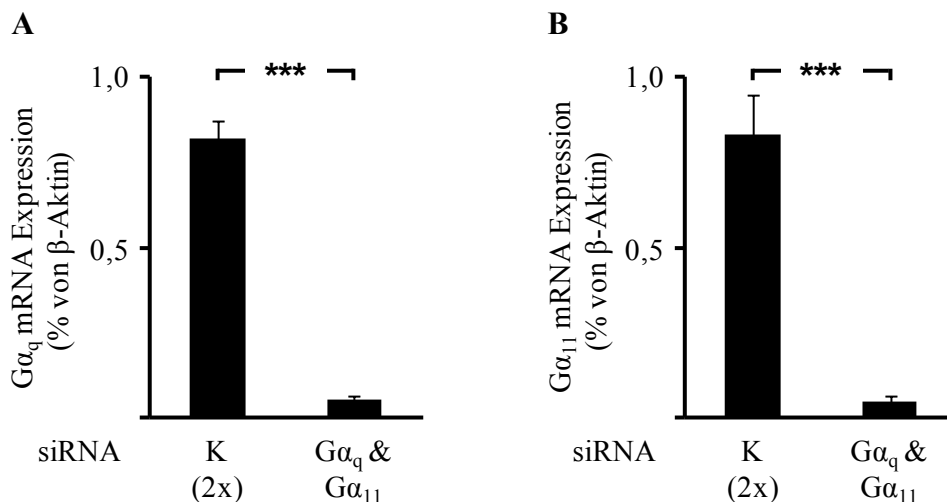


Abb. 5.27: Expression von $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Doppeltransfektion mit siRNA gegen $G\alpha_q$ sowie $G\alpha_{11}$

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden mit der zweifachen Menge Kontroll-siRNA (K (2x)) oder mit siRNA gegen $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ transfiziert und 72 h inkubiert. Die Expression von (A) $G\alpha_q$ und (B) $G\alpha_{11}$ wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels „Student’s t-test“ für verbundene Stichproben (***: $p < 0,001$).

Die Doppeltransfektion mit siRNA gegen $G\alpha_q$ sowie $G\alpha_{11}$ konnte die Expression sowohl von $G\alpha_q$ (Abb. 5.27 A) als auch von $G\alpha_{11}$ (Abb. 5.27 B) signifikant herabsetzen. Es wurden jeweils weniger als 7 % der ursprünglich vorhandenen mRNA Menge exprimiert. Im Anschluss sollte daher untersucht werden, welchen Einfluss die gleichzeitige Herunterregulation von $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ auf die TSH-abhängige RCAN1 Expression hat. Dazu wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen gleichzeitig mit siRNA gegen $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ transfiziert und anschließend mit TSH stimuliert.

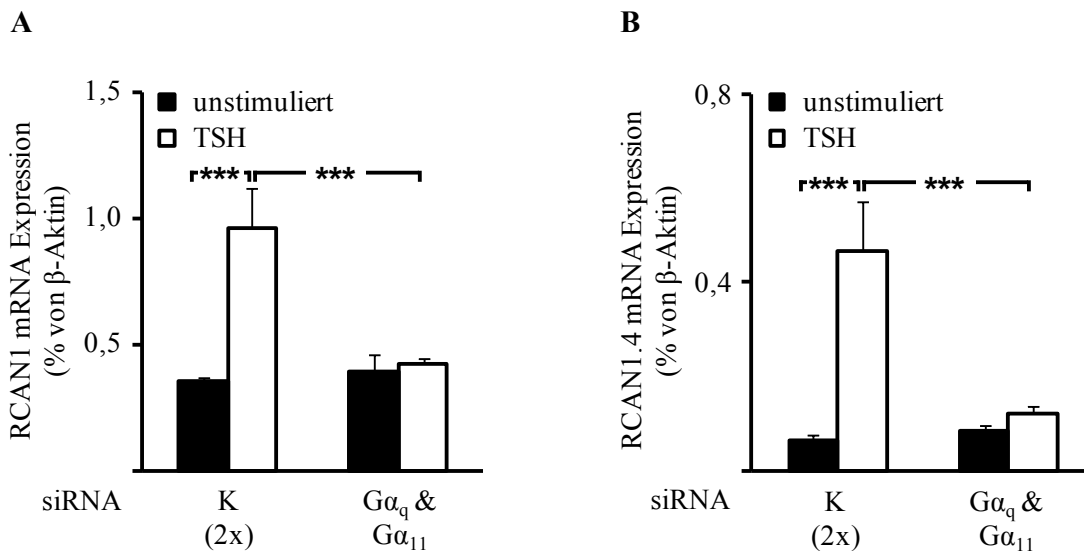


Abb. 5.28: Expression von RCAN1 und RCAN1.4 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Doppeltransfektion mit siRNA gegen $G\alpha_q$ sowie $G\alpha_{11}$ und Stimulation mit TSH

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden mit der zweifachen Menge Kontroll-siRNA (K (2x)) oder mit siRNA gegen $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ transfiziert und 57 h später für 15 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. Die Expression von (A) RCAN1 und (B) RCAN1.4 wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (***: $p < 0,001$).

Die basale Expression von RCAN1 und RCAN1.4 mRNA war nach der Doppeltransfektion von $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ siRNA im Vergleich zu Kontroll-siRNA transfizierten FTC 133 wt TSH-R Zellen nicht signifikant verändert (Abb. 5.28). Dagegen führte die Herunterregulation von $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ zu einer signifikant erniedrigten RCAN1 und RCAN1.4 mRNA-Expression nach einer TSH-Stimulation im Vergleich zu Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. Während bei Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert waren, 0,96 % RCAN1 und 0,47 % RCAN1.4 mRNA bezogen auf β -Aktin vorlagen, wurden nach Einsatz von $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ siRNA nur 0,43 % RCAN1 und 0,12 % RCAN1.4 mRNA bezogen auf β -Aktin exprimiert. Außerdem konnte durch TSH nur bei Kontroll-siRNA transfizierten FTC 133 wt TSH-R Zellen die Expression von RCAN1 und RCAN1.4 mRNA signifikant um das 2,8- bzw. 7,7-fache erhöht werden.

Unstimulierte und TSH-stimulierte FTC 133 wt TSH-R Zellen, die mit siRNA gegen $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ transfiziert worden waren, unterschieden sich dagegen statistisch nicht in ihrer RCAN1 oder RCAN1.4 mRNA-Expression. Das beobachtete Ergebnis deutete darauf hin, dass die TSH-induzierte RCAN1 Expression abhängig von $G\alpha_q$ - und $G\alpha_{11}$ -Proteinen war. Um auszuschließen, dass die verwendeten siRNAs gegen $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ einen unspezifischen Effekt auf die TSH-vermittelte Expression von RCAN1 hatten, wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen abermals sowohl mit $G\alpha_q$ als auch mit $G\alpha_{11}$ siRNA transfiziert und anschließend mit Ionomycin stimuliert, das die Expression von RCAN1 unabhängig von $G\alpha_q$ - und $G\alpha_{11}$ -Proteinen induzieren kann.

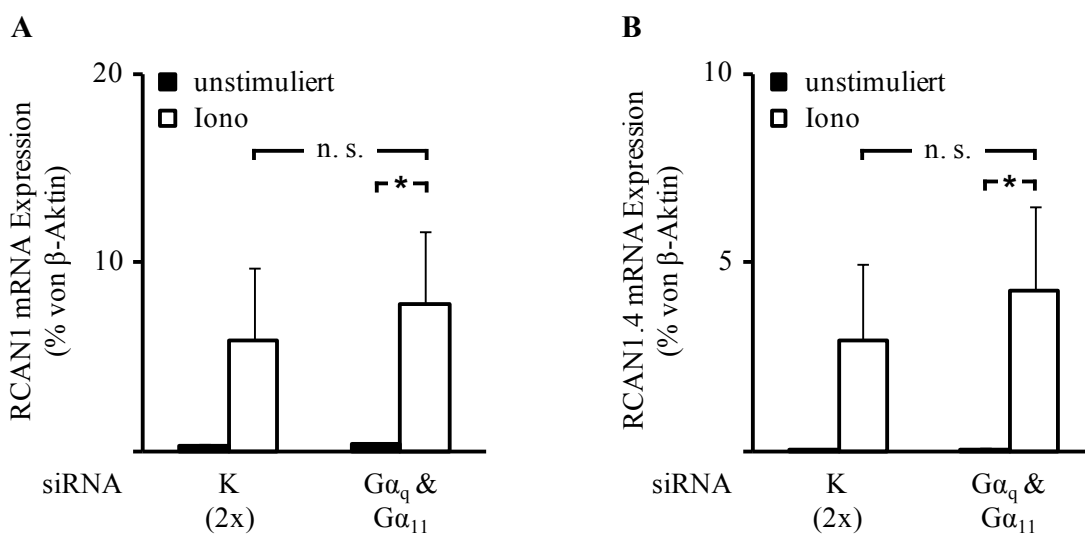


Abb. 5.29: Expression von RCAN1 und RCAN1.4 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Doppeltransfektion mit siRNA gegen $G\alpha_q$ sowie $G\alpha_{11}$ und Stimulation mit Ionomycin

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden mit der zweifachen Menge Kontroll-siRNA (K (2x)) oder mit siRNA gegen $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ transfiziert und 57 h später für 15 h mit Ionomycin (Iono, 0,4 μ M) stimuliert. Die Expression von (A) RCAN1 und (B) RCAN1.4 wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (*: $p < 0,05$; n. s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)).

Nach der Herunterregulation von $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ konnte Ionomycin die Expression von RCAN1 und RCAN1.4 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen signifikant um das 20- bzw. 53-fache erhöhen (Abb. 5.29). Der Vergleich dieser Ionomycin stimulierten Zellen mit Ionomycin-stimulierten Kontroll-siRNA-transfizierten FTC 133 wt TSH-R Zellen zeigte dagegen keine signifikante Veränderung der RCAN1 und RCAN1.4 mRNA-Expression. Ein unspezifischer Effekt der siRNAs gegen $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ auf die TSH-induzierte RCAN1 bzw. RCAN1.4 Expression konnte daher ausgeschlossen werden.

Die auf mRNA-Ebene gezeigte Inhibition der TSH-vermittelten RCAN1 Expression nach $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ Herunterregulation sollte im Anschluss auf Proteinebene bestätigt werden. Dazu wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen erneut mit siRNA gegen $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ oder mit Kontroll-siRNA transfiziert und danach mit TSH stimuliert. Als Positivkontrolle für den Versuchsaufbau wurden die Zellen außerdem mit Ionomycin stimuliert.

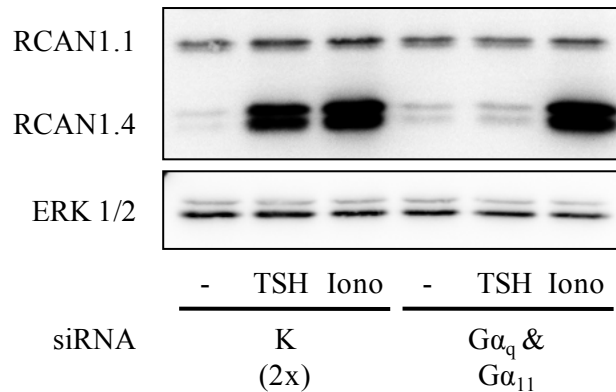


Abb. 5.30: Expression des Proteins RCAN1 in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Doppeltransfektion mit siRNA gegen $G\alpha_q$ sowie $G\alpha_{11}$ und Stimulation mit TSH oder Ionomycin

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden mit der zweifachen Menge Kontroll-siRNA (K (2x)) oder mit siRNA gegen $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ transfiziert und 57 h später für 15 h mit TSH (50 mU/ml) oder Ionomycin (Iono, 0,4 μ M) stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils einen Immunoblot für das Protein RCAN1 (oben) sowie das totale Protein ERK 1/2 als Ladekontrolle (unten).

Bei den mit Kontroll-siRNA transfizierten FTC 133 wt TSH-R Zellen wurde sowohl durch TSH als auch durch Ionomycin die Expression von RCAN1.4 hochreguliert (Abb. 5.30). Zellen, die mit siRNA gegen $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ transfiziert worden waren, konnten dagegen die Proteinexpression von RCAN1.4 nach einer Stimulation mit TSH nicht mehr steigern, während die Stimulation mit Ionomycin davon unbeeinflusst zu einer vermehrten Expression des Proteins RCAN1.4 führte. Die auf mRNA-Ebene beobachteten Effekte wurden somit auf Proteinebene bestätigt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur $G_{q/11}$ -Abhängigkeit zeigten, dass $G\alpha_q$ - und $G\alpha_{11}$ -Proteine essenziell für die TSH-vermittelte RCAN1-Induktion in FTC 133 wt TSH-R Zellen waren. Dabei war es wahrscheinlich ausreichend, wenn entweder $G\alpha_q$ oder $G\alpha_{11}$ in diesen Zellen exprimiert wurde.

5.3.4.6 Einfluss von Calciumionen auf die TSH-induzierte RCAN1-Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, welche Rolle Calciumionen bei der TSH-induzierten RCAN1 Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen spielen. Da die TSH-vermittelte RCAN1 Induktion abhängig von Calcineurin sowie dem Transkrip-

tionsfaktor NFAT ist, sollten auch Calciumionen an der Signaltransduktionskaskade beteiligt sein. Klassischerweise katalysiert die durch $G_{q/11}$ -Proteine aktivierte PLC die Hydrolyse von PIP_2 zu DAG und IP_3 (siehe 3.2.2.3). Über die Aktivierung von IP_3 Rezeptoren im ER werden aus diesem Calciumionen freigesetzt und folglich die $[Ca^{2+}]_i$ erhöht.

Calciumionen-induzierte RCAN1 Expression

Zuerst wurde in diesem Zusammenhang analysiert, ob die alleinige Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ ausreichend war, um eine RCAN1 Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen zu induzieren. Dafür wurden die Zellen mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin oder mit Thapsigargin (TG) inkubiert. TG inhibiert Ca^{2+} -ATPasen im Sarko- und Endoplasmatischen Retikulum (SERCA), wodurch es zu einer langsamen Entleerung der intrazellulären Calciumionenspeicher kommt. Die Folge ist eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$. Sowohl Ionomycin als auch TG waren zwar zuvor bereits als Positivkontrolle für die RCAN1 Induktion angewendet worden, sollten an dieser Stelle aber noch einmal systematisch untersucht werden.

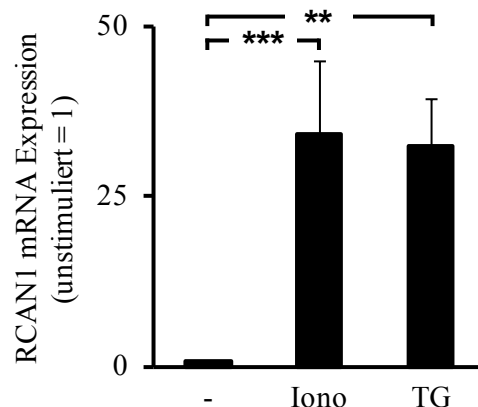


Abb. 5.31: Expression von RCAN1 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit Ionomycin oder Thapsigargin

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 12 h mit Ionomycin (Iono, 0,4 μ M) oder Thapsigargin (TG, 1 μ M) stimuliert. Die Expression von RCAN1 wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt und auf den Basalwert der Zellen normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (**: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Durch beide Stimuli, die über verschiedene Mechanismen die $[Ca^{2+}]_i$ erhöhen, konnte die Expression der RCAN1 mRNA gesteigert werden (Abb. 5.31). Durch Ionomycin wurde diese um das 34-fache gesteigert, während nach einer Stimulation mit Thapsigargin das 32-fache der basal exprimierten RCAN1 mRNA vorhanden war. Dies

stand im Einklang mit der Hypothese, dass eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ ausreichend ist, um die Expression von RCAN1 zu induzieren.

Rolle intrazellulärer Calciumionenspeicher bei der TSH-abhängigen Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$

Die Freisetzung intrazellulärer Calciumionen ist eine klassische zelluläre Antwort nach der Aktivierung des $G_{q/11}$ -abhängigen Signalwegs (siehe 3.2.2.3). Daher sollte als nächstes untersucht werden, ob die TSH-induzierte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ über eine Entleerung intrazellulärer Calciumionenspeicher erfolgt. In diesem Fall sollte die $[Ca^{2+}]_i$ auch nach einem Entfernen von extrazellulären Calciumionen im Puffer TSH-abhängig gesteigert werden können. Dagegen würde eine ausbleibende Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ auf einen TSH-vermittelten Calciumioneneinstrom aus dem Extrazellulärraum hindeuten. Um die TSH-abhängige $[Ca^{2+}]_i$ in Calciumionen-freier Umgebung zu analysieren, wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen mit dem Calciumionenindikator Fura-2 beladen und vor ihrer Messung in HBS-Puffer aufgenommen, der keine zugesetzten Calciumionen und stattdessen den Calciumionen-Chelator EGTA enthielt. Im Fall einer TSH-abhängigen Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ musste diese durch Calciumionen aus dem ER oder anderen intrazellulären Calciumionenspeichern induziert sein.

Ähnlich wie bei physiologischer Calciumionenkonzentration (siehe Abb. 5.3 A) reagierten die FTC 133 wt TSH-R Zellen in Calciumionen-freier Umgebung nahezu sofort mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ auf den Stimulus TSH (Abb. 5.32 A). Die maximale Höhe der Kurve, welche auf die höchste Calciumionenkonzentration in den Zellen zurückzuführen war, wurde nach etwa 30 Sekunden erreicht. Sie lag mit $1,19 \pm 0,05$ etwas niedriger als unter physiologischer Calciumionenkonzentration (Abb. 5.3 A). Etwa 40 Sekunden nach der Stimulation nahm die $[Ca^{2+}]_i$ wieder stetig ab und hatte bei Beendigung der Messung einen Wert von $1,15 \pm 0,05$. Die stabile Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ auch unter Calciumionen-freien Bedingungen legte nahe, dass eine Entleerung von intrazellulären Calciumionenspeichern für die TSH-abhängige Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ verantwortlich war. Die Anwesenheit von extrazellulären Calciumionen war dagegen nicht zwingend erforderlich. Um die TSH-vermittelte $[Ca^{2+}]_i$ bei den beiden Bedingungen besser vergleichen zu können, wurde zur Quantifizierung außerdem der mittlere Ausgangswert von den einzelnen Messwerten subtrahiert und daraus eine Summe gebildet (Abb. 5.32 B). Diese war in Calciumionen-freier Umgebung signifikant niedriger als unter physiologischer Calciumionenkonzentration. Das Ergebnis deutete darauf hin, dass bei der TSH-abhängigen Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ unter physiologischen Bedingungen neben Calciumionen aus intrazellulären Speichern auch extrazelluläre beteiligt waren.

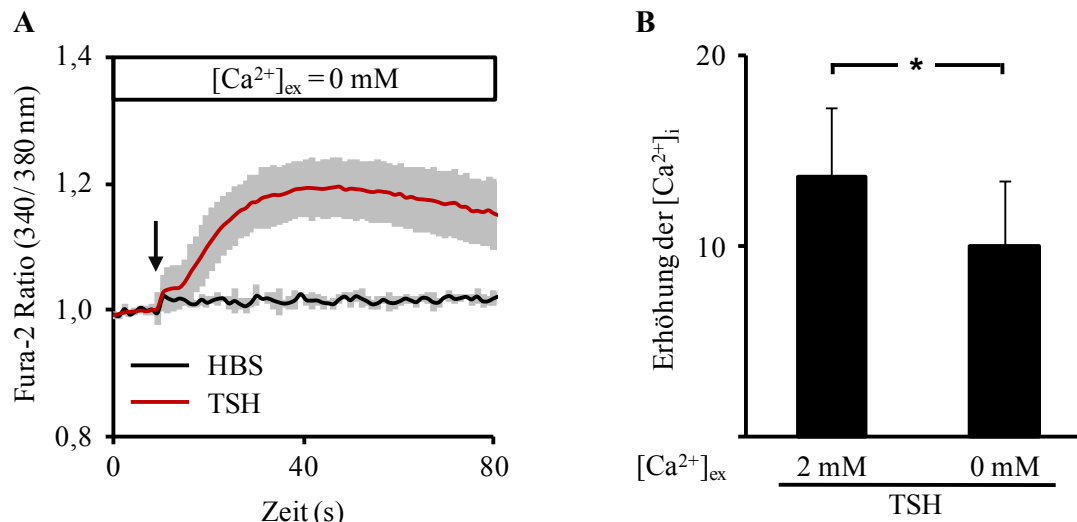


Abb. 5.32: Intrazelluläre Calciumionenkonzentration von FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit TSH in Calciumionen-freier Umgebung

(A) Mit Fura-2 beladene FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden in Calciumionen-freier Umgebung ($[Ca^{2+}]_{ex} = 0$ mM) nach 10 s mit TSH (50 mU/ml) stimuliert, der Pfeil markiert die Injektion des Stimulus. Die Emission bei 510 nm wurde nach Anregung bei 340 nm und 380 nm alle 1,16 s gemessen. Abgebildet ist der normierte Quotient der Emission der beiden Wellenlängen gegen die Zeit. Gemessen wurden 20.000 Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. (B) Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$), berechnet anhand der Summe der einzelnen Messwerte abzüglich des mittleren Ausgangswertes von mit Fura-2 beladenen FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit TSH unter physiologischer extrazellulärer Calciumionenkonzentration ($[Ca^{2+}]_{ex} = 2$ mM, Abb. 5.3 A) sowie in Calciumionen-freier Umgebung ($[Ca^{2+}]_{ex} = 0$ mM). Die statistische Auswertung erfolgte mittels „Student's t-test“ für unverbundene Stichproben (*: $p < 0,05$).

Einfluss von unterschiedlichen extrazellulären Calciumionenkonzentrationen auf die TSH-induzierte RCAN1 Expression

Die stabile TSH-abhängige Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ auch unter Calciumionen-freien Bedingung führte zu der Hypothese, dass die TSH-induzierte RCAN1 Expression durch eine Entleerung intrazellulärer Calciumionenspeicher vermittelt wird und extrazelluläre Calciumionen keine Rolle spielen. Um dies zu überprüfen, wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen bei unterschiedlichen extrazellulären Calciumionenkonzentrationen ($[Ca^{2+}]_{ex}$) mit TSH stimuliert und anschließend die synthetisierte RCAN1 mRNA quantifiziert.

Die TSH-induzierte RCAN1 Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen war abhängig von der $[Ca^{2+}]_{ex}$: je höher diese war, desto mehr RCAN1 mRNA wurde von den Zellen TSH-abhängig exprimiert (Abb. 5.33). So konnte bei absoluter Calciumionenfreiheit im Puffer (erreicht durch die Zugabe des Chelators EGTA) durch TSH keine Expressionssteigerung beobachtet werden. Ohne die Komplexbildung der wenigen noch vorhandenen Calciumionen im HBS-Puffer (die vermutlich aus einer Verunreinigung der Salze stammten, mit dem der Puffer angesetzt war), wurde durch TSH

dagegen fast die 2-fache Menge RCAN1 mRNA wie in unstimulierten Zellen quantifiziert, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant. Eine signifikante Anreicherung von RCAN1 mRNA nach einer Stimulation mit TSH konnte erst bei einer $[Ca^{2+}]_{ex}$ von 0,5 mM beobachtet werden, hier wurde im Vergleich zu unstimulierten FTC 133 wt TSH-R Zellen die 3,4-fache Menge RCAN1 mRNA exprimiert. Bei der physiologischen Calciumionenkonzentration von 2 mM führte die Stimulation mit TSH zu einer 4-fachen Expression von RCAN1 mRNA Vergleich zum Basalwert.

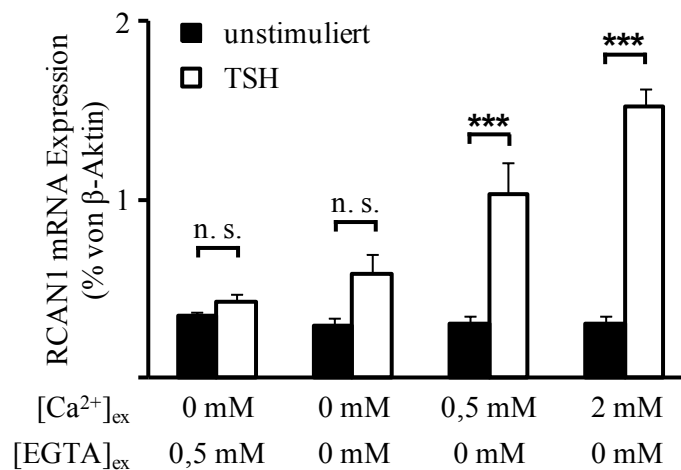


Abb. 5.33: Expression von RCAN1 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen bei verschiedenen extrazellulären Calciumionenkonzentrationen und Stimulation mit TSH

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden in HBS Puffer mit der angegebenen extrazellulären Calciumionen- ($[Ca^{2+}]_{ex}$) und EGTA-Konzentration inkubiert. Gleichzeitig erfolgte eine Stimulation für 4 h mit TSH (50 mU/ml). Die Expression von RCAN1 wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (***: $p < 0,001$; n. s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)).

Die Abhängigkeit der TSH-induzierten RCAN1 Expression von extrazellulären Calciumionen legte nahe, dass die TSH-vermittelte Entleerung von intrazellulären Calciumionenspeichern alleine nicht ausreichend war für eine TSH-induzierte RCAN1 Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen. In diesem Fall müssten zusätzlich zu Calciumionen aus intrazellulären Speichern auch solche aus dem Extrazellulärraum in das Zytosol der Zellen einströmen und die $[Ca^{2+}]_i$ weiter erhöhen. Möglich war jedoch auch, dass die unterschiedlichen Calciumionenkonzentrationen im extrazellulären Puffer die intrazellulären Calciumionenspeicher beeinflussten oder die niedrigen extrazellulären Calciumionenkonzentrationen sich generell toxisch auf die *de novo* mRNA Synthese von FTC 133 wt TSH-R Zellen auswirkten.

Rolle extrazellulärer Calciumionen bei der TSH-abhängigen Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$

Für eine Aktivierung von NFAT wird ein nötiger Calciumioneneinstrom aus dem Extrazellulärraum durch ein Öffnen von Ionenkanälen an der Plasmamembran diskutiert (siehe 3.5.2). Auch die bisher durchgeführten Untersuchungen zur Analyse der Calciumionen-Abhängigkeit bei der TSH-induzierten RCAN1 Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen deuteten an, dass für eine TSH-vermittelte Aktivierung von NFAT und die nachfolgende Induktion von RCAN1 ein Einstrom von extrazellulären Calciumionen notwendig ist. Da auf einen Calciumioneneinstrom aus dem Extrazellulärraum jedoch nur indirekt geschlossen worden war, sollte die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in FTC 133 wt TSH-R Zellen mit Hilfe eines sog. Mangan-, „Quench“-Experiments genauer charakterisiert werden. Durch Manganionen im extrazellulären Puffer können Calciumionen, die aus dem Extrazellulärraum einströmen, funktionell von jenen aus intrazellulären Calciumionenspeichern getrennt werden. Dies ist möglich, da die meisten Calciumionenkanäle in der Plasmamembran auch andere zweiwertige Ionen permeieren lassen und die Fluoreszenz von Fura-2 am isosbestischen Punkt (360 nm) unabhängig von Calciumionen durch Manganionen vermindert wird. Für eine genauere Charakterisierung der TSH-abhängigen Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen daher mit Fura-2 beladen und die Abnahme der Fluoreszenz bei 360 nm nach Stimulation mit TSH in Anwesenheit von manganhaltigem (1mM) HBS-Puffer mittels Echtzeit-Videomikroskopie dokumentiert.

Die Injektion von manganhaltigem HBS-Puffer führte in unstimulierten Zellen zu einer proportionalen Abnahme der Fura-2 Fluoreszenz bei 360 nm (Abb. 5.34 A, schwarze Kurve). Diese wurde vermutlich durch einen gleichmäßigen Manganionen Transport in die Zelle, z. B. über selektive Transporter in der Zellmembran, verursacht. Dagegen nahm die Fluoreszenz etwa 25 Sekunden nach der TSH-Stimulation stärker ab (Abb. 5.34 A, rote Kurve), zu diesem Zeitpunkt gelangten also deutlich mehr extrazelluläre Manganionen in die Zellen als wenn diese nicht stimuliert wurden. Etwa 225 Sekunden nach der Stimulation war die Kurve der mit TSH-stimulierten FTC 133 wt TSH-R Zellen wieder parallel zu der Kurve der unstimulierten Zellen. Um den beobachteten Einstrom von extrazellulären Manganionen statistisch auszuwerten, wurde die Summe der Messwerte nach der Stimulation abzüglich des mittleren Ausgangswerts berechnet und (um positive Werte zu erhalten) mit (-1) multipliziert (Abb. 5.34 B). Dabei zeigte sich, dass der Einstrom von Manganionen in die Zelle bei TSH-stimulierten Zellen signifikant erhöht war. Demnach wurde in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach einer Stimulation mit TSH der Einstrom von Manganionen und so auch von Calciumionen aus dem Extrazellulärraum induziert.

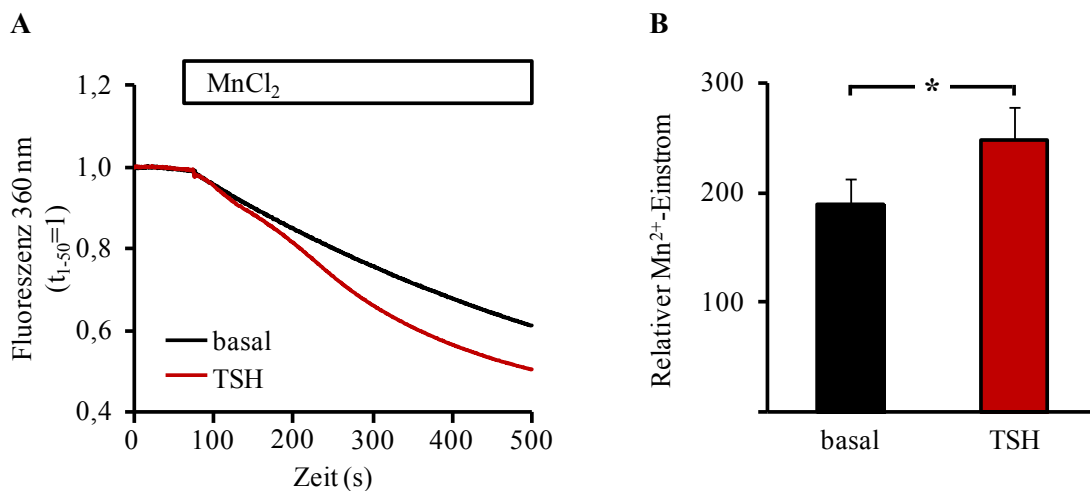


Abb. 5.34: Einstrom bivalenter Kationen in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit TSH
(A) Zu Fura-2 beladenen FTC 133 wt TSH-R Zellen wurde 75 s nach Start der Messung Manganchlorid (MnCl₂, 1 mM) appliziert. Gleichzeitig erfolgte eine Stimulation mit TSH (50 mU/ml, rote Spur). Die Abnahme der Fura-2 Fluoreszenz bei 360 nm, die durch den Einstrom von extrazellulären Manganionen induziert ist, wurde mittels Echtzeit-Videomikroskopie dokumentiert und gegen die Zeit aufgetragen. (B) Zur Quantifizierung des Einstroms bivalenter Kationen wurde die Summe der Messwerte nach der Stimulation abzüglich des mittleren Ausgangswertes der Einzelmessungen aus A mit (-1) multipliziert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels „Student’s t-test“ für verbundene Stichproben (*: $p < 0,05$).

Damit konnte gezeigt werden, dass die TSH-abhängige Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in FTC 133 wt TSH-R Zellen nicht nur durch eine Entleerung von intrazellulären Calciumionenspeichern ausgelöst wurde (Abb. 5.32), sondern auch ein Einstrom von extrazellulären Calciumionen stattfand. Dass die TSH-induzierte RCAN1 Expression abhängig von der Konzentration der extrazellulären Calciumionen war (Abb. 5.33), war als Hinweis darauf zu verstehen, dass eine TSH-abhängige Aktivierung von NFAT nur bei einem Calciumioneneinstrom aus dem Extrazellulärraum stattfand. Eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, die ausschließlich durch die Entleerung intrazellulären Speicher induziert war, schien hierfür nicht ausreichend zu sein.

Einfluss von Speicher-operierten Kanäle auf die TSH-induzierte RCAN1 Expression

Als nächstes sollte der TSH-vermittelte Calciumioneneinstrom aus dem Extrazellulärraum näher charakterisiert werden, da dieser essenziell für die TSH-abhängige NFAT-Aktivierung und Expression von RCAN1 zu sein schien. In vielen Immunzellen und anderen nicht elektrisch erregbaren Zellsystemen wird die NFAT-Aktivierung über Speicher-operierte Ionenkanäle reguliert. Hier wird durch die Entleerung der intrazellulären Speicher das in der ER-Membran befindliche Calcium-sensitive Protein STIM1 aktiviert. Dieses kann durch eine Interaktion mit einem Speicher-operierten Kanal, dem sog. ORAI-Kanal, dessen Öffnung bewirken, so dass

extrazelluläre Calciumionen in die Zellen einströmen können (Hogan et al. 2010). Um zu untersuchen, ob auch die TSH-abhängige RCAN1 Expression durch STIM1 induziert wird, wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen vor und während ihrer Stimulation mit TSH mit dem STIM1 Inhibitor SKF-96365 inkubiert.

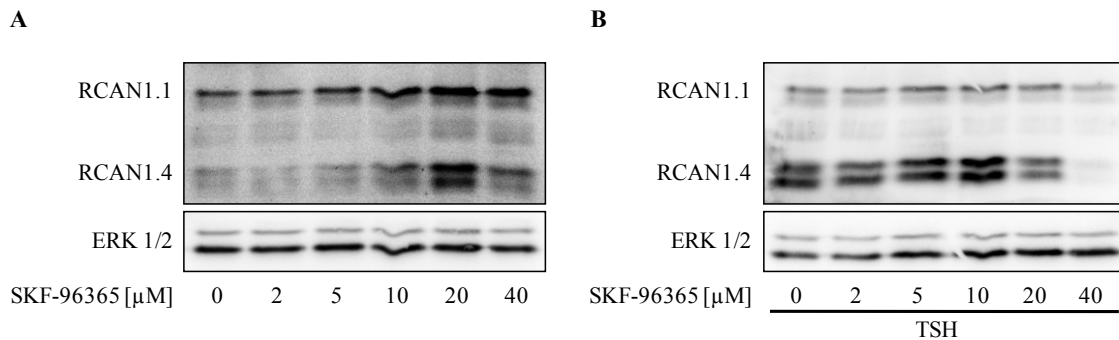


Abb. 5.35: Expression des Proteins RCAN1 in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition von STIM1 und Stimulation mit TSH

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden (A) für 6,5 h mit den angegebenen Konzentrationen des Inhibitors SKF-96365 behandelt oder (B) für 30 min mit den angegebenen Konzentrationen des Inhibitors SKF-96365 vorinkubiert und anschließend für 6 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. Die Abbildungen zeigen einen Immunoblot für das Protein RCAN1 (oben) sowie das totale Protein ERK 1/2 als Ladekontrolle (unten).

Die Inkubation der FTC 133 wt TSH-R Zellen mit SKF-96365 führte bei einer Konzentration bis 20 μ M bereits ohne eine Stimulation mit TSH zu einer gesteigerten Expression von RCAN1 (Abb. 5.35 A). Bei der höheren Konzentration von 40 μ M SKF-96365 wurde dagegen nur wenig mehr RCAN1 Protein exprimiert als unter basalen Bedingungen. Die TSH-abhängige RCAN1 Expression wurde durch 10 μ M SKF-96365 etwas verstärkt, während die Proteinexpression von RCAN1 bei 20 μ M deutlich und bei 40 μ M SKF-96365 komplett inhibiert war (Abb. 5.35 B). Die durchgeführte Untersuchung deutete darauf hin, dass die TSH-vermittelte Aktivierung von NFAT und die dadurch induzierte Expression von RCAN1 abhängig von STIM1 waren.

5.3.4.7 Analyse von Cofaktoren für NFAT bei der TSH-induzierten RCAN1 Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Bei der Induktion von Zielgenen interagieren NFAT Proteine in der Regel mit anderen Transkriptionsfaktoren (siehe 3.5.3). Im Folgenden sollte daher analysiert werden, ob bei der TSH-vermittelten Expression von RCAN1 neben der Aktivierung von NFAT auch andere Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielen.

Einfluss von AP-1 auf die TSH-induzierte RCAN1 Expression

Für viele Gene, die in Immunzellen NFAT-abhängig induziert werden, konnte eine Kooperation von NFAT mit dem Transkriptionsfaktor AP-1 gezeigt werden. Dieser ist ein heterodimerer Komplex, der aus Proteinen der Fos- und Jun-Familien gebildet wird. Um zu analysieren, ob AP-1 auch bei der TSH-vermittelten RCAN1 Induktion mit NFAT interagieren könnte, wurde zuerst überprüft, ob in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach einer TSH-Stimulation c-Fos und c-Jun mRNA gebildet wird.

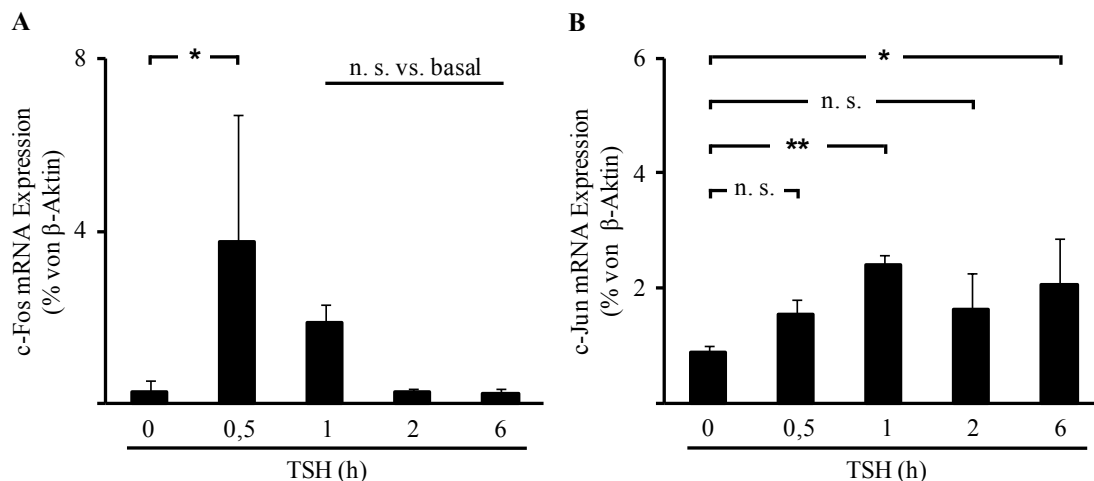


Abb. 5.36: Expression von c-Fos und c-Jun mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit TSH

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 0; 0,5; 1; 2; oder 6 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. Die Expression von (A) c-Fos und (B) c-Jun wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; n. s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)).

Die TSH-Stimulation der FTC 133 wt TSH-R Zellen führte zu einem Zeit-abhängigen Anstieg der c-Fos mRNA-Expression, wobei nach 30 Minuten mehr als die 13-fache Menge c-Fos mRNA wie bei unstimulierten Zellen vorhanden war (Abb. 5.36 A). Nach einer Stunde wurde ebenfalls mehr mRNA nachgewiesen als unter basalen Bedingungen, dieser Unterschied war statistisch jedoch nicht mehr signifikant. Auch nach längerer Inkubation mit dem Stimulus war die Menge der exprimierten c-Fos mRNA nicht signifikant vom Basalwert zu unterscheiden. Die Expression der c-Jun mRNA wurde durch die Stimulation mit TSH ebenfalls Zeit-abhängig erhöht (Abb. 5.36 B). Nach einer Stunde wurde die meiste mRNA nachgewiesen, sie war im Vergleich zum Basalwert um den Faktor 2,7 erhöht.

Da in FTC 133 wt TSH-R Zellen sowohl c-Fos als auch c-Jun TSH-abhängig induziert wurden, war die Bildung von AP-1 nach einer Stimulation mit TSH möglich. Ob der Transkriptionsfaktor auch bei der TSH-vermittelten und NFAT-abhängigen

RCAN1 Induktion eine Rolle spielte, sollte als nächstes analysiert werden. Da die TSH-abhängige Expression zumindest von c-Fos in FTC 133 wt TSH-R Zellen abhängig von MEK ist (Büch et al. 2008), wurden die Zellen vor ihrer Stimulation mit dem MEK-Inhibitor U0126 vorinkubiert.

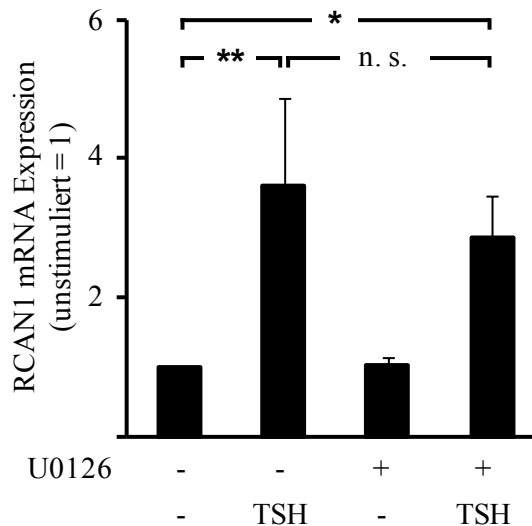


Abb. 5.37: Expression von RCAN1 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition von MEK und Stimulation mit TSH

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 30 min mit dem Inhibitor U0126 (5 μ M) vorinkubiert und anschließend für 12 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. Die Expression von RCAN1 wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt und auf den Basalwert der Zellen normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; n. s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)).

Durch die Inhibition von MEK wurde die TSH-vermittelte RCAN1 Induktion zwar etwas reduziert, der Unterschied war statistisch jedoch nicht signifikant und auch nach Vorinkubation mit dem Inhibitor konnte die mRNA-Expression von RCAN1 durch TSH signifikant um das 3,8-fache erhöht werden (Abb. 5.37). Daher war eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors AP-1 an der TSH-induzierten RCAN1 Induktion unwahrscheinlich.

Analyse einer direkten TSH-induzierten RCAN1 Expression

Da AP-1 nicht nur aus c-Fos und c-Jun Heterodimeren, sondern auch aus c-Jun Homodimeren gebildet werden kann und c-Jun in FTC 133 wt TSH-R Zellen möglicherweise über einen MAPK-unabhängigen Signalweg induziert wird, sollte im Folgenden die allgemeine Beteiligung von neu synthetisierten Proteinen bei der TSH-induzierten RCAN1 Expression analysiert werden. Dafür wurden FTC 133 wt TSH-R

Zellen vor ihrer Stimulation mit Cycloheximid inkubiert, das die Gentranslation von Eukaryonten inhibiert.

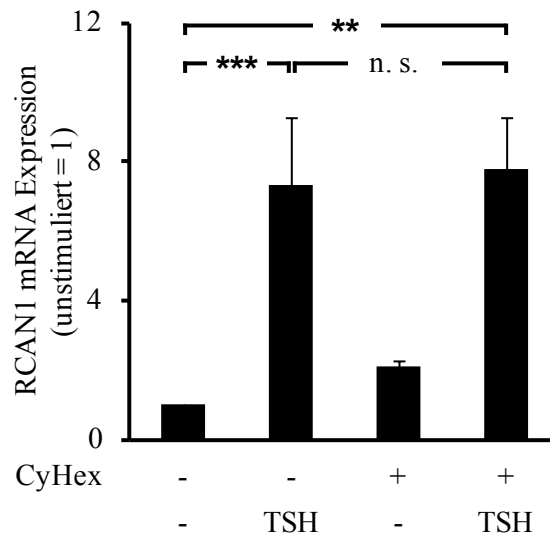


Abb. 5.38: Expression von RCAN1 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition der Gentranslation und Stimulation mit TSH

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 30 min mit dem Inhibitor Cycloheximid (CyHex, 25 μ M) vorinkubiert und anschließend für 12 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. Die Expression von RCAN1 wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt und auf den Basalwert der Zellen normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (**: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; n. s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)).

Die Inkubation mit Cycloheximid alleine führte bei unstimulierten FTC 133 wt TSH-R Zellen zu einer 2-fachen Expression von RCAN1 mRNA, allerdings war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant (Abb. 5.38). Auch nach einer Stimulation mit TSH wurde trotz einer Inhibition der Gentranslation keine signifikante Veränderung in der RCAN1 mRNA-Expression beobachtet. Um zu überprüfen, ob bei der verwendeten Cycloheximid-Konzentration in FTC 133 wt TSH-R Zellen wirklich keine Gentranslation mehr stattfinden konnte, wurden die Zellen erneut vor ihrer TSH-Stimulation mit Cycloheximid inkubiert und nachfolgend die Proteinexpression von c-Fos untersucht.

Nach der Vorinkubation von FTC 133 wt TSH-R Zellen mit Cycloheximid konnte durch TSH keine Expression von c-Fos Protein induziert werden (Abb. 5.39). Dieses Ergebnis zeigte, dass Cycloheximid die Gentranslation von FTC 133 wt TSH-R Zellen inhibierte. Daher war die TSH-abhängige Induktion von RCAN1 unabhängig von einer Neusynthese von Proteinen und somit unabhängig von AP-1 und anderen Transkriptionsfaktoren, die neu synthetisiert werden mussten.

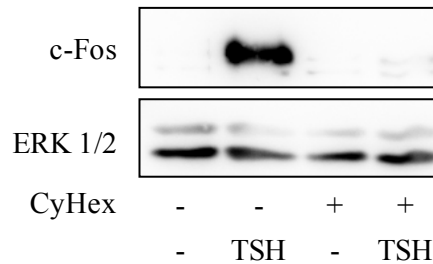


Abb. 5.39: Expression des Proteins c-Fos in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition der Gentranslation und Stimulation mit TSH

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 30 min mit dem Inhibitor Cycloheximid (CyHex, 25 μ M) vorinkubiert und anschließend für 2 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils einen Immunoblot für das c-Fos Protein (oben) sowie das totale Protein ERK 1/2 als Ladekontrolle (unten).

5.3.4.8 Funktionelle Analysen zur TSH-induzierten RCAN1 Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Nachdem der Signalweg von der TSH-R-Aktivierung bis zur RCAN1 Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen analysiert worden war, sollten funktionelle Aspekte dieser Expression charakterisiert werden. Da bei einer Überexpression aufgrund unphysiologisch hoher Konzentrationen des Proteins oftmals unspezifische Effekte auftreten, sollte stattdessen die Expression von RCAN1 verhindert werden. Die Inhibition der RCAN1 Expression mittels Calcineurin-Inhibitoren oder INCA-6 kann jedoch auch Effekte auf andere Proteine haben, daher sollte Expression von RCAN1 mit Hilfe von spezifischen siRNAs herunterreguliert werden.

Herunterregulation von RCAN1 mittels siRNA

Bevor mit funktionellen Analysen zur TSH-vermittelten RCAN1 Expression begonnen werden konnte, musste zuerst überprüft werden, ob die spezifischen siRNAs eine Expression von RCAN1 verhindern konnten. Dazu wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen mit drei verschiedenen siRNAs gegen RCAN1 (I-III) transfiziert und die Expression sowohl von RCAN1.1 als auch von RCAN1.4 mRNA quantifiziert. Um sicherzustellen, dass durch die spezifischen siRNAs auch die TSH-vermittelte RCAN1.4 Expression herunterreguliert werden konnte, wurden die Zellen außerdem nach ihrer Transfektion mit TSH stimuliert.

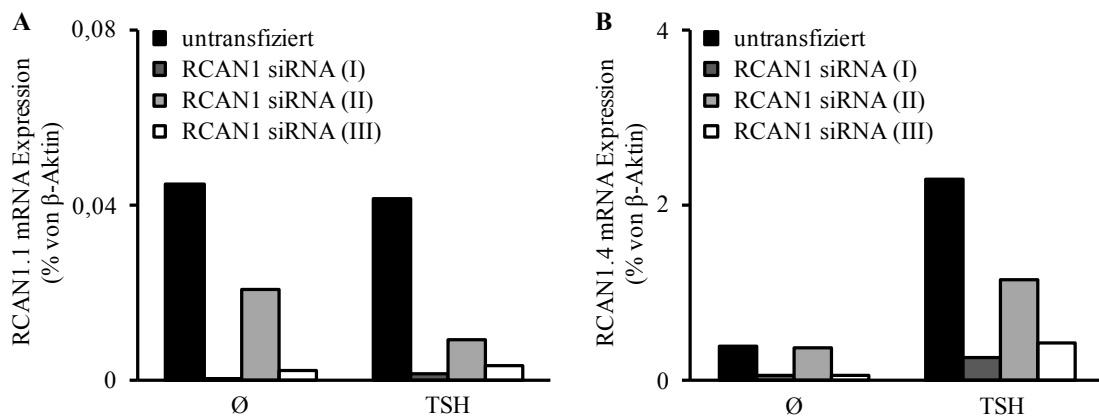


Abb. 5.40: Expression von RCAN1.1 sowie RCAN1.4 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen RCAN1 und Stimulation mit TSH

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden mit drei verschiedenen siRNAs gegen RCAN1 ((I), (II), (III)) transfiziert und 57 h später für 15 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. Die Expression von (A) RCAN1.1 und (B) RCAN1.4 wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt. Dargestellt sind die Werte aus einem Experiment.

Die Expression von RCAN1.1 und RCAN1.4 mRNA konnte durch die drei verschiedenen siRNAs unterschiedlich stark herunterreguliert werden, wobei jedoch keine gegensätzlichen Effekte auf RCAN1.1 und RCAN1.4 beobachtet wurden (Abb. 5.40). Die höchste Effizienz wurde durch die RCAN1 siRNA (I) erzielt, nach ihrer Transfektion konnte fast kein spezifisches RCAN1.1 mRNA Produkt mehr nachgewiesen werden und die basale mRNA-Expression von RCAN1.4 war um 87 % verringert. Ähnlich effizient konnte auch die TSH-induzierte RCAN1.4 Expression um 89 % herunterreguliert werden.

Die Herunterregulation von RCAN1 sollte außerdem auf Proteinebene bestätigt werden. Hierfür wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen erneut mit den drei verschiedenen siRNAs gegen RCAN1 (I-III) sowie zusätzlich mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA transfiziert und anschließend mit TSH stimuliert.

Bereits die Transfektion mit Kontroll-siRNA führte in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach einer Stimulation mit TSH zu einer verminderten Expression sowohl des Proteins RCAN1.1 als auch des Proteins RCAN1.4 im Vergleich zu untransfizierten Zellen (Abb. 5.41). Dieser Effekt wurde vermutlich durch die allgemeine Toxizität einer siRNA Transfektion hervorgerufen, da auch in der Ladekontrolle bei nativen Zellen mehr Protein vorhanden war als in siRNA-transfizierten Zellen. Die Intensitäten der Banden von Zellen, die mit spezifischer siRNA gegen RCAN1 transfiziert worden waren, wurden an dieser Stelle daher ausschließlich mit denen von Kontroll-siRNA transfizierten Zellen verglichen. Die drei verschiedenen siRNAs gegen RCAN1 konnten sowohl die TSH-unabhängige Isoform RCAN1.1 als auch die TSH-induzierte Isoform

RCAN1.4 unterschiedlich stark unterdrücken, wobei sich das Verhältnis der beiden Isoformen nicht veränderte. Das auf mRNA-Ebene erhaltene Ergebnis wurde auf Proteinebene bestätigt. Die stärkste Herunterregulation von RCAN1.1 und RCAN1.4 wurde auf Proteinebene ebenfalls durch die RCAN1 siRNA (I) hervorgerufen. Die RCAN1 siRNA (III) konnte die Expression von RCAN1.1 und RCAN1.4 auch inhibieren, allerdings war dieser Effekt sichtbar schwächer. Nahezu keinen Effekt hatte dagegen die RCAN1 siRNA (II). Das Protein RCAN1.1 wurde unter ihrer Anwendung etwas schwächer exprimiert, die TSH-abhängige RCAN1.4 Expression konnte dagegen fast nicht reduziert werden.

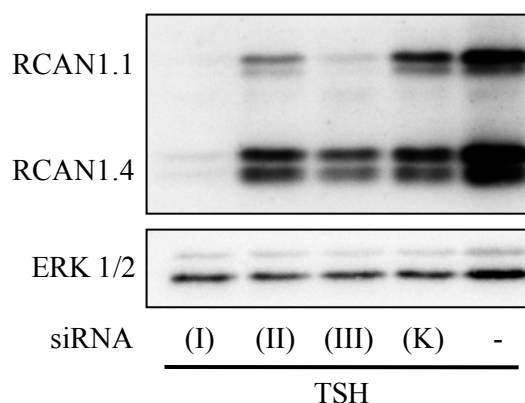


Abb. 5.41: Expression des Proteins RCAN1 in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen RCAN1 und Stimulation mit TSH

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden mit siRNA gegen RCAN1 ((I), (II), (III)) oder Kontroll-siRNA (K) transfiziert und 57 h später für 15 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. Die Abbildungen zeigen einen Immunoblot für das Protein RCAN1 (oben) sowie das totale Protein ERK 1/2 als Ladekontrolle (unten).

Für die folgenden Analysen zur Funktion der TSH-induzierten RCAN1 Expression wurde daher die am besten funktionierende RCAN1 siRNA (I) zur Herunterregulation von RCAN1 in FTC 133 wt TSH-R Zellen transfiziert. In funktionellen Untersuchungen wurden die Zellen dann mit TSH stimuliert und mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen verglichen.

Analyse der TSH-induzierten RCAN1 Expression auf die Zellproliferation von FTC 133 wt TSH-R Zellen

Zuerst sollte analysiert werden, ob die TSH-abhängige RCAN1 Expression einen Effekt auf die Zellproliferation hat. Dazu wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen nach einer Transfektion mit siRNA gegen RCAN1 oder Kontroll-siRNA für einen Proliferationstest ausgesät und gleichzeitig für 24 Stunden mit TSH stimuliert. Die Proliferation der Zellen wurde dann im Zeitraum von 192 h (8 Tage) mit Hilfe des XTT-Reagenzes mehrfach bestimmt.

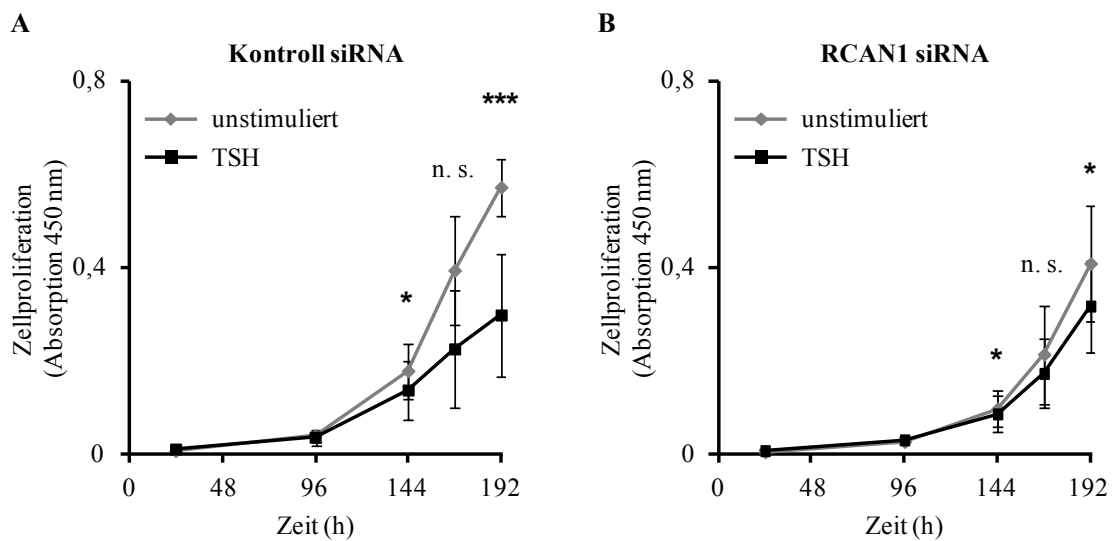


Abb. 5.42: Analyse der Zellproliferation von FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen RCAN1 und Stimulation mit TSH

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden mit (A) Kontroll-siRNA oder (B) siRNA gegen RCAN1 transfiziert, 48 h später neu ausgesät und gleichzeitig für 24 h mit TSH (50 mU/ml, schwarze Kurve) stimuliert. Die Zellproliferation wurde 24; 96; 144; 168 und 192 h nach Zellaussaat mittels XTT und Absorptionsmessung bei 450 nm bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels „Student's t-test“ für verbundene Stichproben (*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$; n. s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)).

Bei FTC 133 wt TSH-R Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert worden waren, führte die Stimulation mit TSH nach 144 bis 192 Stunden zu einer verringerten Zellproliferation (Abb. 5.42 A). Dieser Effekt war 192 Stunden nach der Zellaussaat am deutlichsten ausgeprägt. Hier wurde in unstimulierten Zellen bei 450 nm eine Absorption von 0,57 gemessen, während die Absorption, die proportional zur Zellproliferation ist, bei der Stimulation mit TSH nur einen Wert von 0,30 erreichte. In FTC 133 wt TSH-R Zellen, die mit siRNA gegen RCAN1 transfiziert worden waren, konnte erst 192 Stunden nach der Zellaussaat eine eindeutige und signifikante Verringerung in der Zellproliferation nach der Stimulation mit TSH beobachtet werden (Abb. 5.42 B). Allerdings waren die Unterschiede zwischen unstimulierten und mit TSH stimulierten Zellen hier deutlich schwächer, die gemessenen Absorptionen lagen bei 0,41 und 0,32. Beim Vergleich der jeweils unstimulierten Zellen fiel auf, dass die Zellproliferation nach Transfektion mit siRNA gegen RCAN1 ab dem Zeitpunkt von 144 Stunden nach Zellaussaat mit einer Absorption von 0,10 deutlich niedriger war als nach Transfektion mit Kontroll-siRNA, wo eine Absorption von 0,18 gemessen wurde. Dieser Unterschied war einem p -Wert kleiner als 0,05 signifikant, demnach wirkte sich die siRNA gegen RCAN1 bereits auf unstimulierte FTC 133 wt TSH-R Zellen wachstumsinhibierend oder toxisch aus. Nach der Stimulation mit TSH wurde dieser

Effekt jedoch aufgehoben, da sich die Zellproliferationen hier von Kontroll-siRNA und RCAN1 siRNA transfizierten Zellen statistisch nicht voneinander unterschieden.

Analyse der TSH-induzierten RCAN1 Expression auf die Koloniebildung von FTC 133 wt TSH-R Zellen

Um die RCAN1-vermittelten Effekte auf die Zellproliferation besser einordnen zu können, wurde im Anschluss eine Analyse der Koloniebildungsfähigkeit durchgeführt. Während bei der Bestimmung der Zellproliferation mittels XTT neben der Proliferationsrate auch Zelltod und –seneszenz eine Rolle spielen und nicht voneinander getrennt werden können, sollte nun ausschließlich die Toxizität der siRNA gegen RCAN1 mit jener der Kontroll-siRNA verglichen werden. Dazu wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen mit Kontroll-siRNA oder siRNA gegen RCAN1 transfiziert und mit TSH stimuliert. Im Anschluss wurden jeweils 1000 Zellen für eine Untersuchung der Koloniebildungsfähigkeit ausgesät und etwa 1,5 Wochen später angefärbt. Zur Auswertung wurden die gebildeten Zellkolonien unabhängig von ihrer Größe manuell gezählt.

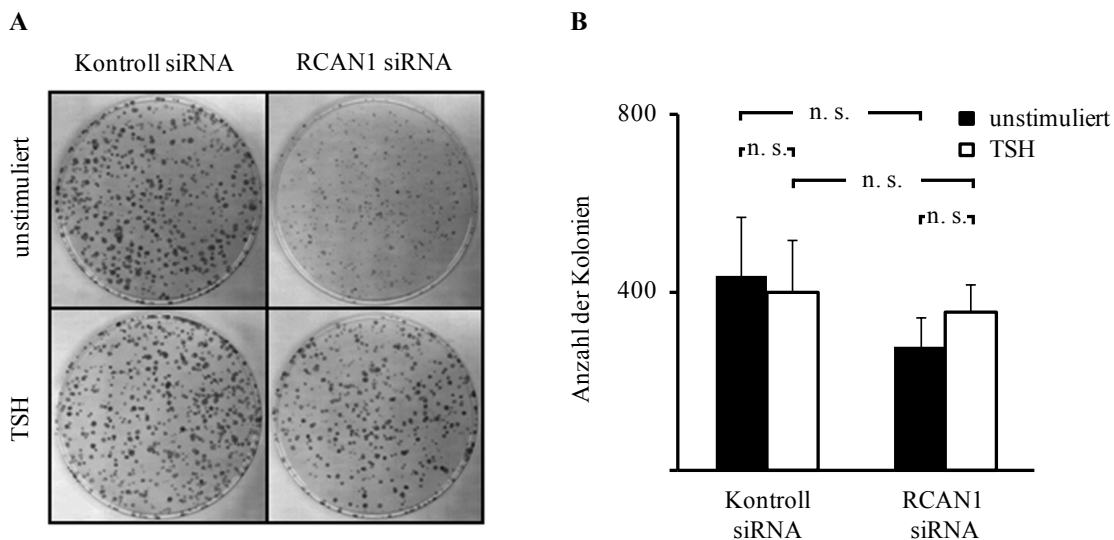


Abb. 5.43: Analyse der Koloniebildungsfähigkeit von FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen RCAN1 und Stimulation mit TSH

(A) FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden mit Kontroll-siRNA (links) oder siRNA gegen RCAN1 (rechts) transfiziert und 57 h später für 15 h mit TSH (50 mU/ml, unten) stimuliert. Im Anschluss erfolgte die Aussaat von 1000 Zellen für die Analyse der Koloniebildungsfähigkeit. Nach etwa 1,5 Wochen wurden die Zellen fixiert und angefärbt. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Koloniebildung aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. (B) Zur Auswertung wurden die angefärbten Kolonien unabhängig von ihrer Größe manuell ausgezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey.

Nach dem Anfärben der Kolonien wurden Unterschiede bei den verschiedenen Bedingungen sichtbar (Abb. 5.43 A). Die unstimulierten Zellen, welche mit Kontroll-siRNA transfiziert worden waren, hatten große und gut sichtbare Kolonien ausgebildet. Bei den mit siRNA gegen RCAN1 transfizierten Zellen zeigten sich dagegen nur sehr kleine Kolonien. Durch die Stimulation mit TSH wurde dieser Effekt aufgehoben und sowohl nach der Transfektion mit Kontroll-siRNA als auch nach der Transfektion mit siRNA gegen RCAN1 waren große und gut sichtbare Kolonien vorhanden. Bei den unstimulierten und mit RCAN1 siRNA transfizierten Zellen wurden die wenigsten Kolonien gezählt, im Durchschnitt wurden hier 278 Kolonien bei 1000 ausgesäten Zellen ausgebildet (Abb. 5.43 B). Bei unstimulierten, mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen wurden dagegen im Durchschnitt 438 Kolonien gezählt. Die mit TSH stimulierten FTC 133 wt TSH-R Zellen unterschieden sich mit 400 gebildeten Kolonien bei Kontroll-siRNA transfizierten Zellen nur wenig von den mit siRNA gegen RCAN1 transfizierten Zellen, die im Durchschnitt 356 Kolonien ausgebildet hatten. Die Unterschiede in den Koloniezahlen waren statistisch nicht signifikant, daher deutete die Auswertung darauf hin, dass die Expression von RCAN1 siRNA keinen Effekt auf die Koloniebildung von FTC 133 wt TSH-R Zellen hatte und somit nicht zytotoxisch für die Zellen war.

Analyse der TSH-induzierten RCAN1 Expression auf die Zellmigration von FTC 133 wt TSH-R Zellen

In FTC 133 Zellen, die den TSH-R nicht stabil überexprimieren, wurde RCAN1 in Überexpressionsstudien als Inhibitor der Zellmigration beschrieben (Espinosa et al. 2009). Um zu überprüfen, ob auch durch TSH induziertes RCAN1.4 die Migration von FTC 133 wt TSH-R Zellen regulieren konnte, wurden die Zellen mit Kontroll-siRNA oder siRNA gegen RCAN1 transfiziert, mit TSH stimuliert und anschließend die Migration mit Hilfe des sog. Boyden-Chamber Migrationstests analysiert. Dazu wurden Zellen auf ein mikroporöses Substrat ausgesät. Nach acht Stunden Inkubation im Brutschrank wurde ausgewertet, wie viele Zellen durch die Poren migriert waren.

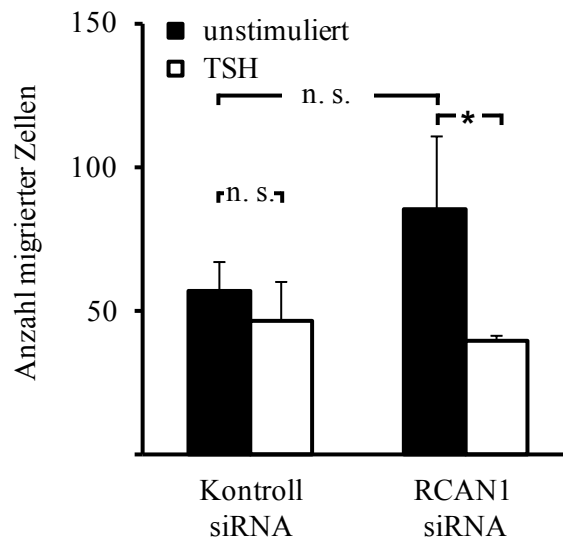


Abb. 5.44: Analyse der Zellmigration von FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen RCAN1 und Stimulation mit TSH

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden mit Kontroll-siRNA oder siRNA gegen RCAN1 transfiziert und 57 h später für 15 h mit TSH (50 mU/ml, unten) stimuliert. Im Anschluss erfolgte die Aussaat von 1000 Zellen für den Boyden-Chamber Migrationstest. Nach 8 h wurden die Zellen fixiert und angefärbt. Zur Auswertung wurden durch die Poren migrierten Zellen manuell ausgezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (*: $p < 0,05$; n. s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)).

Nach der Herunterregulation der RCAN1 Expression migrierten im Durchschnitt 85 FTC 133 wt TSH-R Zellen, während bei Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert worden waren, etwa 57 Zellen migriert waren (Abb. 5.44). Dieser Unterschied könnte darauf hindeuten, dass sich die basale RCAN1.1 Expression negativ auf die Migration von Zellen auswirkte, allerdings war er statistisch nicht signifikant. Nach der Stimulation der Zellen mit TSH war die Anzahl migrierter Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert worden waren, nicht signifikant zu unstimulierten Zellen verändert. Dagegen wurde die Migration von FTC 133 wt TSH-R Zellen, die mit siRNA gegen RCAN1 transfiziert worden waren, von im Durchschnitt 85 auf 40 migrierte Zellen nach einer Stimulation mit TSH reduziert. Dieses Ergebnis legte nahe, dass die TSH-induzierte RCAN1.4 Expression die Migration von FTC 133 wt TSH-R Zellen förderte. Der Migrations-fördernde Effekt von RCAN1.4 wurde jedoch in Zellen, in denen RCAN1 nicht herunterreguliert worden war, nach einer Stimulation mit TSH von anderen Faktoren maskiert.

5.3.5 TSH-induzierte RCAN1 Expression in RO82-W-1 Zellen

Nachdem die TSH-vermittelte Expression von RCAN1 in FTC 133 wt TSH-R Zellen detailliert analysiert worden war, sollte diese in einem Zellsystem mit endogenem TSH-R bestätigt werden. Hierfür wurde die Zelllinie RO82-W-1 ausgewählt, da diese auf den Stimulus TSH mit einer deutlichen Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ reagiert hatte (siehe Abb. 5.3 D).

5.3.5.1 TSH-induzierte Expression von RCAN1 mRNA in RO82-W-1 Zellen

Zuerst sollte die Expression von RCAN1 nach einer Stimulation mit TSH in RO82-W-1 Zellen auf mRNA-Ebene überprüft werden. Dazu wurden die Zellen für verschiedene Zeiträume mit TSH inkubiert und anschließend die exprimierte RCAN1 mRNA quantifiziert.

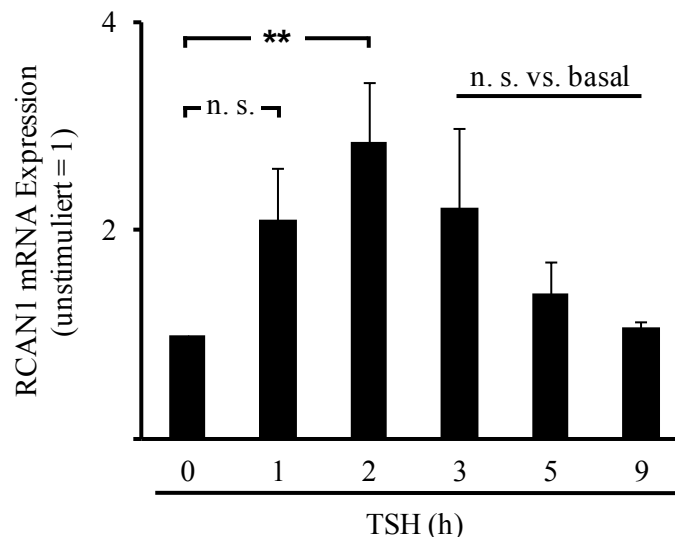


Abb. 5.45: Expression von RCAN1 mRNA in RO82-W-1 Zellen nach Stimulation mit TSH

RO82-W-1 Zellen wurden für 0; 1; 2; 3; 5 und 9 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. Die Expression von RCAN1 wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt und auf den Basalwert der Zellen normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (**: $p < 0,01$; n. s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)).

Die Stimulation mit TSH führte in RO82-W-1 Zellen zu einem Zeit-abhängigen Anstieg der RCAN1 mRNA-Expression (Abb. 5.45). Bereits nach einer Stunde war die vorhandene RCAN1 mRNA-Menge 2-fach vorhanden, unterschied sich jedoch statistisch nicht von unstimulierten Zellen. Nach zwei Stunden Inkubation mit TSH war die RCAN1 mRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant erhöht, hier wurde etwa die 2,9-fache Menge exprimiert. Im weiteren Zeitverlauf wurde die

vorhandene RCAN1 mRNA wieder weniger, nach 3 Stunden TSH-Stimulation war der Unterschied zum Basalwert nicht mehr signifikant.

5.3.5.2 TSH-induzierte mRNA-Expression der RCAN1-Isoformen RCAN1.1 und RCAN1.4 in RO82-W-1 Zellen

Wie in FTC 133 wt TSH-R Zellen sollte in RO82-W-1 Zellen analysiert werden, ob die TSH-induzierte Expression der RCAN1 mRNA abhängig von NFAT war. Zunächst wurde daher überprüft, ob diese durch eine Expression der Calcineurin-abhängigen Isoform RCAN1.4 zustande gekommen war oder durch RCAN1.1 vermittelt wurde. Die Zeit-abhängige mRNA-Expression der beiden Isoformen RCAN1.1 und RCAN1.4 nach einer Stimulation mit TSH wurde daher mit spezifischen Primern analysiert.

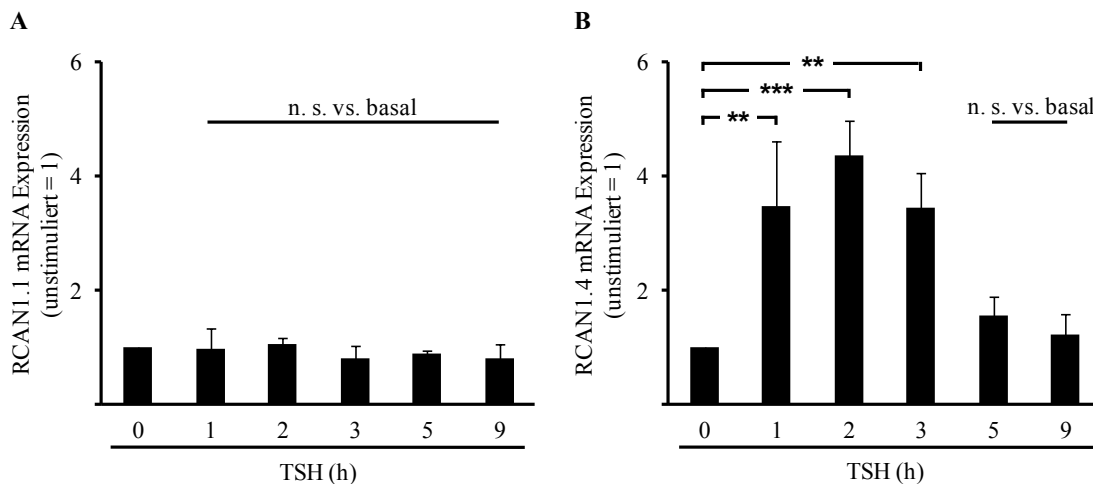


Abb. 5.46: Expression von RCAN1.1 und RCAN1.4 mRNA in RO82-W-1 Zellen nach Stimulation mit TSH

RO82-W-1 Zellen wurden für 0; 1; 2; 3; 5 und 9 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. Die Expression von (A) RCAN1.1 und (B) RCAN1.4 wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt und auf den Basalwert der Zellen normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (**: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; n. s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)).

Die Stimulation mit TSH konnte die Menge der RCAN1.1 mRNA nicht signifikant verändern (Abb. 5.46 A). Dagegen wurde die mRNA-Expression von RCAN1.4 Zeit-abhängig erhöht (Abb. 5.46 B). Im Zeitraum von ein bis drei Stunden nach der Stimulation wurde signifikant mehr mRNA exprimiert als bei unstimulierten RO82-W-1 Zellen, wobei die RCAN1.4 mRNA-Expression ihr Maximum zwei Stunden nach der TSH-Applikation erreichte. Hier war mehr als die 4-fache Menge vorhanden. Dass die

TSH-induzierte RCAN1 Expression auch in RO82-W-1 Zellen abhängig von der Isoform RCAN1.4 war, sprach für eine Abhängigkeit von Calcineurin und NFAT.

5.3.5.3 TSH-induzierte Expression des Proteins RCAN1 in RO82-W-1 Zellen

Die auf mRNA-Ebene beobachtete Induktion von RCAN1 in RO82-W-1 Zellen durch TSH sollte als nächstes auf Proteinebene überprüft werden. Dazu wurden RO82-W-1 Zellen für verschiedene Zeiträume mit TSH stimuliert.

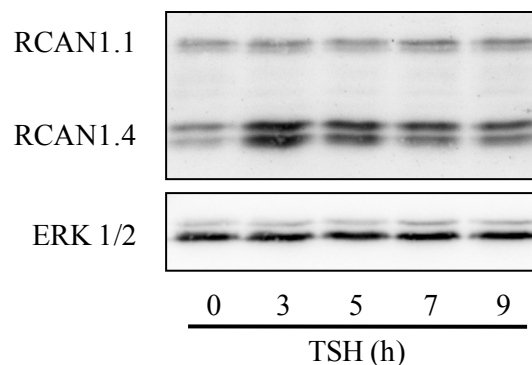


Abb. 5.47: Expression des Proteins RCAN1 in RO82-W-1 Zellen nach Stimulation mit TSH

RO82-W-1 Zellen wurden für 0; 3; 5; 7 oder 9 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils einen Immunoblot für das Protein RCAN1 (oben) sowie das totale Protein ERK 1/2 als Ladekontrolle (unten).

Wie auch auf mRNA-Ebene, führte in RO82-W-1 Zellen die Inkubation mit TSH zu einem Zeit-abhängigen Anstieg des Proteins RCAN1.4, während es bei RCAN1.1 zu keiner Veränderung in den Intensitäten der einzelnen Banden kam (Abb. 5.47). Die maximale Expression von RCAN1.4 wurde drei Stunden nach der Stimulation mit TSH erreicht und nahm im Folgenden wieder ab. Damit konnte die in RO82-W-1 Zellen auf mRNA-Ebene beobachtete TSH-induzierte Expression von RCAN1.4 im Immunoblot auf Proteinebene bestätigt werden.

5.3.5.4 Analyse einer Calcineurin/NFAT-Aktivierung bei der TSH-induzierten RCAN1 Expression in RO82-W-1 Zellen

Einfluss von Calcineurin-Inhibitoren auf die TSH-induzierte RCAN1 Expression

Um die Calcineurin-Abhängigkeit der TSH-vermittelten RCAN1.4 Induktion zu überprüfen, wurden RO82-W-1 Zellen vor ihrer Stimulation mit TSH mit den beiden Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A (CsA) und Tacrolimus (FK 506) inkubiert.

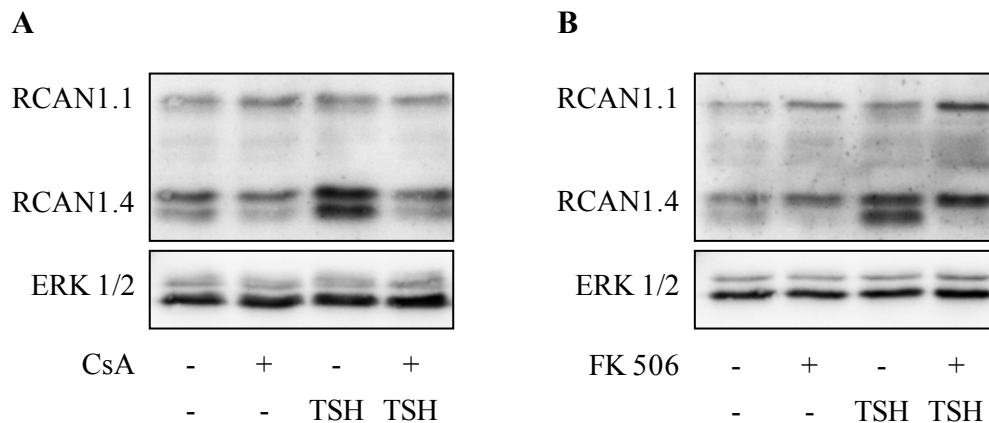


Abb. 5.48: Expression des Proteins RCAN1 in RO82-W-1 Zellen unter Inhibition von Calcineurin und Stimulation mit TSH

RO82-W-1 Zellen wurden für 30 min mit (A) dem Inhibitor Cyclosporin A (CsA, 1 μ M) oder (B) dem Inhibitor Tacrolimus (FK 506, 50 nM) vorinkubiert und anschließend für 3 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. Die Abbildungen zeigen einen Immunoblot für das Protein RCAN1 (oben) sowie das totale Protein ERK 1/2 als Ladekontrolle (unten).

Die Vorinkubation mit den Calcineurin-Inhibitoren führte nach einer Stimulation mit TSH zu einer verringerten Expression des Proteins RCAN1.4 (Abb. 5.48). Hierbei wurde durch CsA die TSH-abhängige Expression von RCAN1.4 komplett inhibiert. FK 506 reduzierte dagegen nur die Intensität der unteren RCAN1.4 Proteinbande, während die Intensität der oberen RCAN1.4 Proteinbande nicht verändert wurde.

Einfluss von INCA-6 auf die TSH-induzierte RCAN1 Expression

Nach der Blockierbarkeit der TSH-abhängigen RCAN1 Induktion durch Calcineurin-Inhibitoren sollte auch die direkte Abhängigkeit von NFAT analysiert werden. Dazu wurden RO82-W-1 Zellen vor ihrer TSH-Stimulation mit dem Inhibitor INCA-6 vorinkubiert, der spezifisch die Interaktion zwischen Calcineurin und NFAT blockiert.

Die Vorinkubation mit dem Inhibitor des NFAT-Signalweges konnte die durch TSH induzierte Expression des Proteins RCAN1.4 blockieren (Abb. 5.49). In der Zusammenschau zeigten diese Analysen, dass die TSH-vermittelte RCAN1.4 Expression auch in RO82-W-1 Zellen abhängig von der Aktivierung des Calcineurin/NFAT-Signalwegs war.

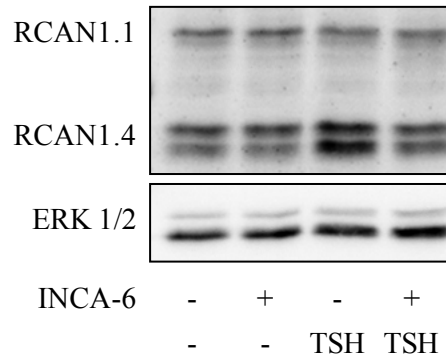


Abb. 5.49: Expression des Proteins RCAN1 in RO82-W-1 Zellen unter Inhibition von NFAT und Stimulation mit TSH

RO82-W-1 Zellen wurden für 30 min mit dem Inhibitor INCA-6 (5 μ M) vorinkubiert und anschließend für 3 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. Die Abbildungen zeigen einen Immunoblot für das Protein RCAN1 (oben) sowie das totale Protein ERK 1/2 als Ladekontrolle (unten).

5.3.5.5 Rolle der G-Protein-Aktivierung bei der TSH-induzierten RCAN1 Expression in RO82-W-1 Zellen

Einfluss von $G_{q/11}$ -Proteinen auf die TSH-induzierte RCAN1 Expression

Da für die FTC 133 wt TSH-R Zellen bereits gezeigt worden war, dass die TSH-induzierte Expression von RCAN1 abhängig von G_{α_q} - sowie $G_{\alpha_{11}}$ -Proteinen war, wurde in RO82-W-1 Zellen ebenfalls diese Abhängigkeit analysiert. Wie auch in FTC 133 wt TSH-R sollten die Proteine in RO82-W-1 Zellen mittels spezifischer siRNA herunterreguliert werden, dafür wurden die bereits getesteten siRNAs G_{α_q} (II) und $G_{\alpha_{11}}$ (II) verwendet (siehe Abschnitt 5.3.4.5, „Einfluss von $G_{q/11}$ Proteinen auf die TSH-induzierte RCAN1 Expression“, insbesondere Abb. 5.25). Um zunächst die Herunterregulations-Effizienz der siRNAs zu überprüfen, wurden die Zellen gleichzeitig mit diesen transfiziert und anschließend die mRNA der beiden G-Proteine quantifiziert.

Mit den siRNAs gegen G_{α_q} und $G_{\alpha_{11}}$ konnte sowohl die Expression von G_{α_q} mRNA (Abb. 5.50 A) als auch die Expression von $G_{\alpha_{11}}$ mRNA (Abb. 5.50 B) in RO82-W-1 Zellen signifikant herunterreguliert werden, während die Kontroll-siRNA keinen Einfluss auf die Expression der beiden mRNAs hatte. Im Bezug auf Kontroll-siRNA transfizierte RO82-W-1 Zellen führte die Transfektion mit G_{α_q} und $G_{\alpha_{11}}$ siRNA zu einer G_{α_q} mRNA Herunterregulation von etwa 92 Prozent. Ähnlich effizient wurde auch die $G_{\alpha_{11}}$ mRNA-Expression blockiert, im Bezug auf Kontroll-siRNA transfizierte Zellen waren 93 Prozent nach der Transfektion mit G_{α_q} und $G_{\alpha_{11}}$ siRNA herunterreguliert.

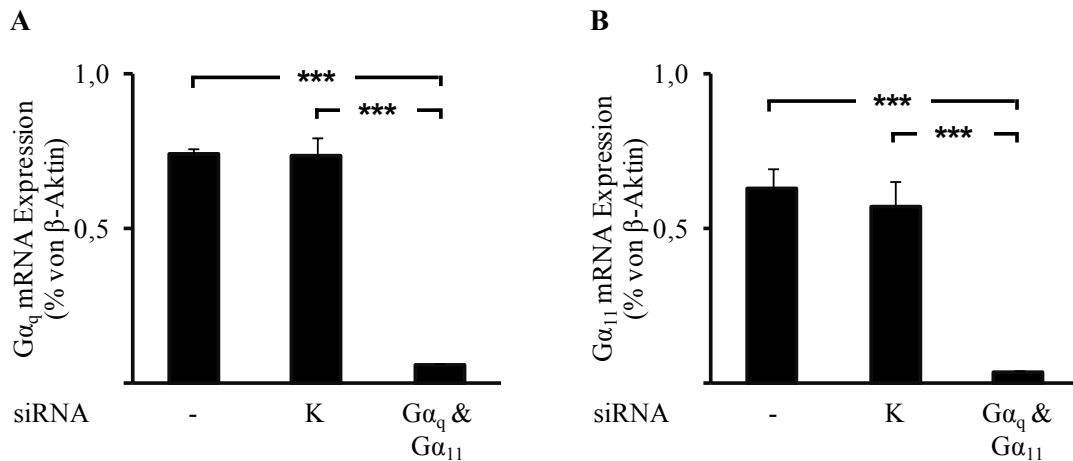


Abb. 5.50: Expression von Gα_q und Gα₁₁ mRNA in RO82-W-1 Zellen nach Doppeltransfektion mit siRNA gegen Gα_q sowie Gα₁₁

RO82-W-1 Zellen wurden mit Kontroll-siRNA (K) oder der jeweils halben Menge siRNA gegen Gα_q und Gα₁₁ transfiziert und 72 h im Brutschrank inkubiert. Die Expression von (A) Gα_q und (B) Gα₁₁ wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β-Aktin als Referenz bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (± SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (***: p < 0,001).

Da die Expression von Gα_q und Gα₁₁ auch in RO82-W-1 Zellen durch die siRNAs blockiert wurde, konnte nun analysiert werden, welchen Effekt diese Herunterregulation auf die TSH-vermittelte RCAN1 Induktion hat. Dazu wurden RO82-W-1 Zellen erneut mit Kontroll-siRNA oder mit siRNA gegen Gα_q und Gα₁₁ transfiziert und anschließend mit TSH stimuliert.

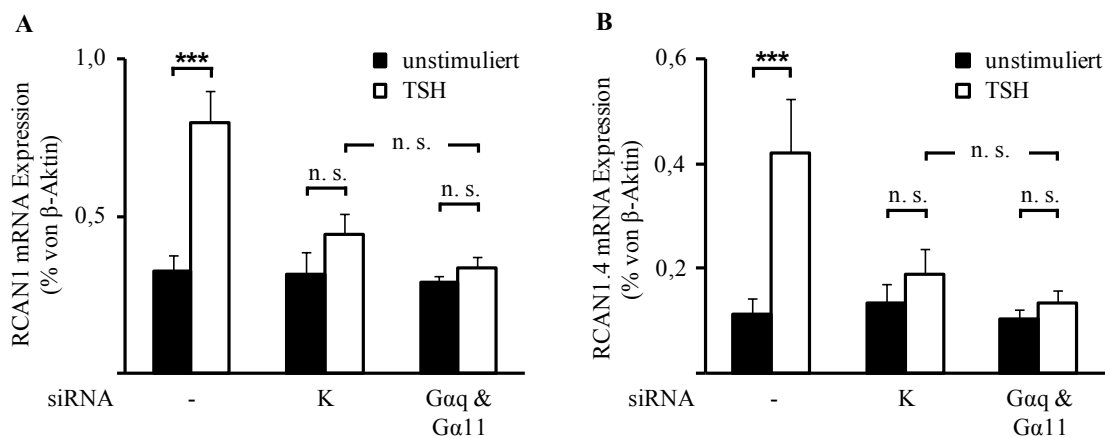


Abb. 5.51: Expression von RCAN1 und RCAN1.4 mRNA in RO82-W-1 Zellen nach Doppeltransfektion mit siRNA gegen Gα_q sowie Gα₁₁ und Stimulation mit TSH

RO82-W-1 Zellen wurden mit Kontroll-siRNA (K) oder der jeweils halben Menge siRNA gegen Gα_q und Gα₁₁ transfiziert und 70 h später für 2 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. Die Expression von (A) Gα_q und (B) Gα₁₁ wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β-Aktin als Referenz bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (± SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (***: p < 0,001; n. s.: nicht signifikant (p > 0,05)).

Nach Transfektion der Negativkontrolle (Kontroll-siRNA) konnte in RO82-W-1 Zellen durch Stimulation mit TSH nur noch eine sehr geringe Steigerung der RCAN1 und RCAN1.4 mRNA-Expression induziert werden, diese war jedoch nicht signifikant (Abb. 5.51). Nach der Doppeltransfektion mit $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ siRNA war die durch TSH induzierte RCAN1 und RCAN1.4 Expression zwar noch weiter vermindert, dieser Effekt war jedoch im Vergleich zu Kontroll-siRNA transfizierten RO82-W-1 Zellen nicht signifikant. Aufgrund des Effekts der Kontroll-siRNA ließen die gezeigten mRNA Daten keine Aussage zur $G\alpha_q$ - und $G\alpha_{11}$ -Abhängigkeit bei der TSH-induzierten Expression von RCAN1.4 zu.

Um die Abhängigkeit von $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ bei der TSH-vermittelten RCAN1.4 Expression in RO82-W-1 Zellen abschließend zu untersuchen, sollte diese auf Proteinebene analysiert werden. Dafür wurden RO82-W-1 Zellen erneut mit siRNA gegen $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ oder mit Kontroll-siRNA transfiziert und danach mit TSH stimuliert.

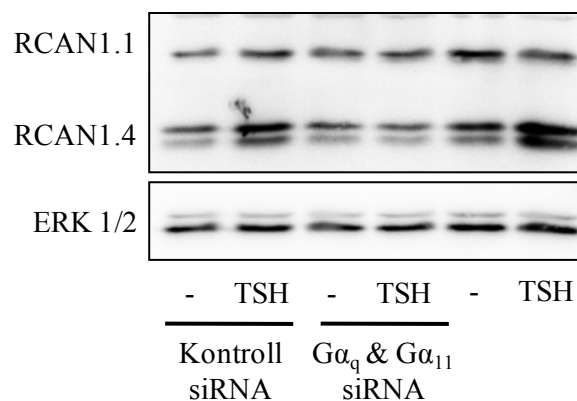


Abb. 5.52: Expression des Proteins RCAN1 in RO82-W-1 Zellen nach Doppeltransfektion mit siRNA gegen $G\alpha_q$ sowie $G\alpha_{11}$ und Stimulation mit TSH

RO82-W-1 Zellen wurden mit Kontroll-siRNA oder der jeweils halben Menge siRNA gegen $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ transfiziert und 69 h später für 3 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils einen Immunoblot für das Protein RCAN1 (oben) sowie das totale Protein ERK 1/2 als Ladekontrolle (unten).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen auf mRNA-Ebene konnte die Expression des Proteins RCAN1.4 trotz einer Transfektion mit Kontroll-siRNA nach Stimulation mit TSH in RO82-W-1 Zellen gesteigert werden (Abb. 5.52). Nach Herunterregulation von $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ mittels siRNA konnte TSH die Expression von RCAN1.4 nicht mehr erhöhen. Dieses Ergebnis legte eine Beteiligung von $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ bei der TSH-induzierten Expression von RCAN1.4 in RO82-W-1 Zellen nahe. Damit schien wahrscheinlich, dass in RO82-W-1 Zellen nach einer Aktivierung des TSH-R dieselbe Signalkaskade wie in FTC 133 wt TSH-R Zellen zur Expression von RCAN1.4 mRNA und Protein führte.

5.3.5.6 Funktionelle Analysen zur TSH-induzierten RCAN1 Expression in RO82-W-1 Zellen

Herunterregulation von RCAN1 mittels siRNA

Im Folgenden sollten funktionelle Aspekte bei der TSH-induzierten RCAN1.4 Expression in RO82-W-1 Zellen analysiert werden. Wie auch in FTC 133 wt TSH-R Zellen wurde hierfür die Expression von RCAN1 mit Hilfe einer spezifischen siRNA herunterreguliert. Um zu überprüfen, ob diese die Expression von RCAN1 in RO82-W-1 Zellen verhindern konnte, wurden die Zellen mit der bereits in Abschnitt 5.3.4.8 getesteten RCAN1 siRNA (I) sowie einer unspezifischen Kontroll-siRNA transfiziert und mit TSH oder Ionomycin stimuliert.

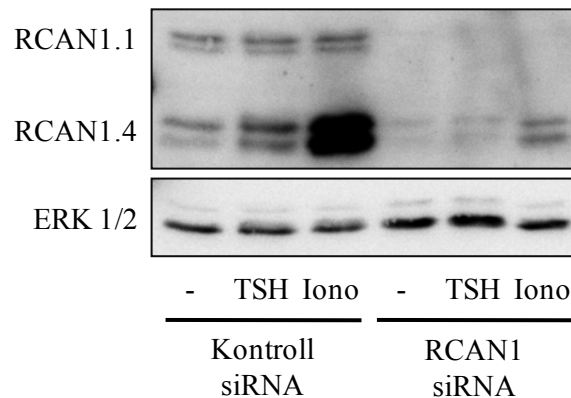


Abb. 5.53: Expression des Proteins RCAN1 in RO82-W-1 Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen RCAN1 und Stimulation mit TSH oder Ionomycin

RO82-W-1 Zellen wurden mit siRNA gegen RCAN1 oder Kontroll-siRNA transfiziert und 69 h später für 3 h mit TSH (50 mU/ml) oder Ionomycin (Iono, 0,4 μ M) stimuliert. Die Abbildungen zeigen einen Immunoblot für das Protein RCAN1 (oben) sowie das totale Protein ERK 1/2 als Ladekontrolle (unten).

Nach Transfektion der RO82-W-1 Zellen mit siRNA gegen RCAN1 war die Expression des Proteins RCAN1.1 nicht mehr nachweisbar (Abb. 5.53). Auch die Proteinexpression von RCAN1.4 war sehr deutlich herabgesetzt und nur die Stimulation mit Ionomycin führte zu einer noch deutlich sichtbaren Proteinbande. Bei Kontroll-siRNA transfizierten Zellen wurde dagegen sowohl das Protein RCAN1.1 als auch das Protein RCAN1.4 exprimiert. Die Stimulation mit TSH führte zu einer gesteigerten Expression von RCAN1.4 und die Positivkontrolle Ionomycin konnte die Proteinexpression von RCAN1.4 noch deutlicher erhöhen. Demnach konnte die verwendete siRNA gegen RCAN1 dessen Expression in RO82-W-1 Zellen herabsetzen und wurde daher in nachfolgenden funktionellen Untersuchungen zur Herunterregulation von RCAN1 in RO82-W-1 Zellen transfiziert.

Analyse der TSH-induzierten RCAN1 Expression auf die Zellproliferation von RO82-W-1 Zellen

Zur funktionellen Analyse der TSH-abhängigen RCAN1 Expression sollte überprüft werden, ob diese einen Effekt auf die Zellproliferation von RO82-W-1 Zellen hat. Dazu wurden RO82-W-1 Zellen mit siRNA gegen RCAN1 oder Kontroll-siRNA transfiziert und anschließend für einen Proliferationstest ausgesät. Bei ihrer Aussaat erfolgte gleichzeitig eine Stimulation mit TSH für 24 Stunden. Die Proliferation der Zellen wurde im Zeitraum von 192 Stunden (8 Tagen) mittels XTT-Reagenz bestimmt.

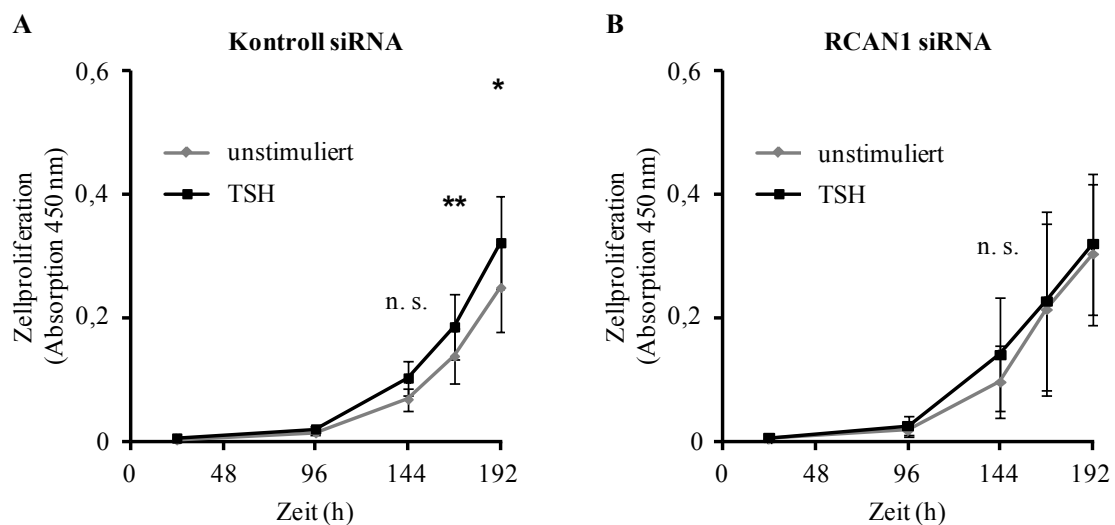


Abb. 5.54: Analyse der Zellproliferation von RO82-W-1 Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen RCAN1 und Stimulation mit TSH

RO82-W-1 Zellen wurden mit (A) Kontroll-siRNA oder (B) siRNA gegen RCAN1 transfiziert, 48 h später neu ausgesät und gleichzeitig für 24 h mit TSH (50 mU/ml, schwarze Kurve) stimuliert. Die Zellproliferation wurde 24, 96, 144, 168 und 192 h nach Zellaussaat mittels XTT und Absorptionsmessung bei 450 nm bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels „Student’s t-test“ für verbundene Stichproben (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; n. s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)).

In RO82-W-1 Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert worden waren, führte die Stimulation mit TSH im Zeitraum von 168 bis 192 Stunden zu einer signifikant erhöhten Zellproliferation (Abb. 5.54 A). Bei unstimulierten Zellen wurde zum Zeitpunkt 192 Stunden bei 450 nm eine mittlere Absorption von 0,25 gemessen, während TSH-stimulierte RO82-W-1 Zellen zu diesem Zeitpunkt eine mittlere Absorption von 0,32 aufwiesen. Die Zellproliferation der RO82-W-1 Zellen, die mit siRNA gegen RCAN1 transfiziert worden waren, wurde durch die Stimulation mit TSH dagegen nicht signifikant beeinflusst (Abb. 5.54 B). Auch der Vergleich von unstimulierten Zellen, die mit siRNA gegen RCAN1 transfiziert worden waren mit solchen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert worden waren, zeigte keine signifikanten

Veränderungen. Die beobachtete Zellproliferation der transfizierten und mit TSH stimulierten RO82-W-1 Zellen war damit gegensätzlich zu FTC 133 wt TSH-R Zellen (siehe Abb. 5.42). Hier hatte die Stimulation von Kontroll-siRNA transfizierten Zellen mit TSH zu einer verringerten Zellproliferation geführt, außerdem war die Zellproliferation in unstimulierten FTC 133 wt TSH-R Zellen, die mit siRNA gegen RCAN1 transfiziert worden waren, im Vergleich zu solchen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert worden waren, erniedrigt.

Die Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien sollten im Folgenden näher charakterisiert werden.

5.3.5.7 Expression der TSH-R mRNA in follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien

Um die gegensätzlichen Ergebnisse in den beiden Zelllinien FTC 133 wt TSH-R und RO82-W-1 nach einer Stimulation mit TSH sowie der Herunterregulation von RCAN1 auf die Zellproliferation besser einordnen zu können, sollte zuerst deren Expression des TSH-R auf mRNA-Ebene quantifiziert werden. Da die TSH-R Expression der RO82-W-1 Zellen nicht ausschließlich mit FTC 133 wt TSH-R Zellen, die den TSH-R überexprimieren, verglichen werden sollte, wurde die TSH-R mRNA-Expression auch in anderen follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien überprüft.

Die FTC 133 wt TSH-R Zellen exprimierten etwa 2 % TSH-R mRNA bezogen auf β -Aktin (Abb. 5.55). Für die RO82-W-1 Zellen konnte dagegen kein spezifisches PCR-Produkt nachgewiesen werden, ebenso nicht für CGTH-W-1 und TT2609-C02 Zellen. Dagegen wurde in HTC 238 und ML-1 Zellen, die den TSH-R ebenso wie die RO82-W-1 Zellen nicht überexprimieren, TSH-R mRNA exprimiert, entsprechend 0,46 % bzw. 0,31 % von β -Aktin. Da der verwendete Primer für den TSH-R alle drei Isoformen des Rezeptors erkennt und mit der angewandten Methode auch endogen exprimierter Rezeptor nachgewiesen werden konnte, muss an dieser Stelle eine TSH-R Expression der RO82-W-1 Zellen negativ beurteilt werden. Daher wurden mit dieser Zelllinie keine weiteren Experimente durchgeführt.

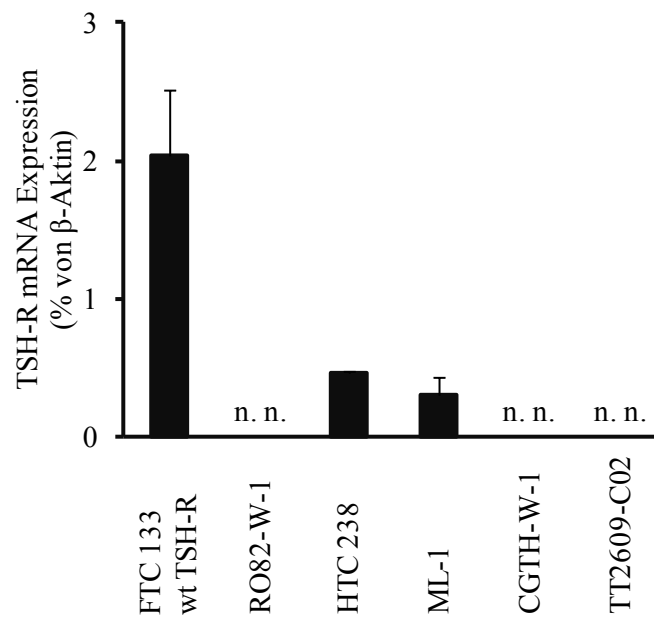


Abb. 5.55: Expression von Thyreotropin-Rezeptor (TSH-R) mRNA in follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien

Die Expression des TSH-R in den Zelllinien FTC 133 wt TSH-R, RO82-W-1, HTC 238, ML-1, CGTH-W-1 und TT2609-C02 wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. n. n.: nicht nachweisbar

5.3.6 TSH-induzierte Cox-2 Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Nachdem RCAN1 als NFAT-abhängiges Zielgenen in FTC 133 wt TSH-R Zellen identifiziert und charakterisiert worden war, sollte zum Abschluss eine potenzielle NFAT-induzierte Expression der Cyclooxygenase 2 (Cox-2) analysiert werden. Eine Hochregulation von Cox-2 ist in vielen Krebszellen beschrieben und wird mit der Tumorigenese in Verbindung gebracht. Die Expression von Cox-2 kann z. B. durch Wachstumsfaktoren oder Zytokine induziert werden. Dies kann über eine Aktivierung von NFAT geschehen, da in der Promoterregion von Cox-2 zwei NFAT-Bindungsstellen enthalten sind (Iñíguez et al. 2000).

5.3.6.1 TSH-induzierte Expression von Cox-2 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Um eine NFAT-abhängige Cox-2 Regulation in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach einer Stimulation mit TSH zu untersuchen, wurden die Zellen mit unterschiedlichen TSH-Konzentrationen stimuliert.

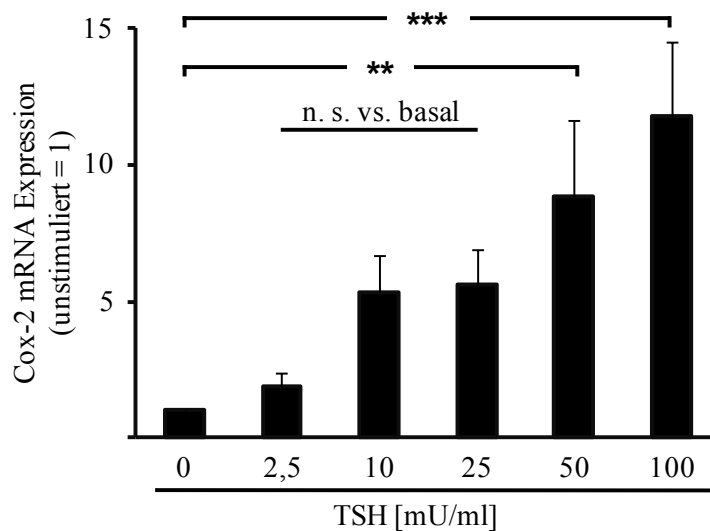


Abb. 5.56: Expression von Cox-2 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit TSH

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 12 h mit den angegebenen TSH-Konzentrationen stimuliert. Die Expression von Cox-2 wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt und auf den Basalwert der Zellen normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (**: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; n. s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)).

Die Stimulation mit TSH führte zu einem Konzentrations-abhängigen Anstieg der Cox-2 mRNA-Expression (Abb. 5.56). Nach der Stimulation mit 50 mU/ml TSH war die Expression signifikant zum Basalwert erhöht. Hier wurde mehr als die 8-fache Menge wie in unstimulierten Zellen exprimiert. Die Expression der Cox-2 mRNA konnte durch 100 mU/ml TSH noch weiter gesteigert werden, gegenüber dem Ausgangswert war diese um das 11,8-fache erhöht.

5.3.6.2 TSH-induzierte Expression des Proteins Cox-2 in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Der auf mRNA-Ebene beobachtete Anstieg der Cox-2 Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach einer Stimulation mit TSH sollte auf Proteinebene bestätigt werden.

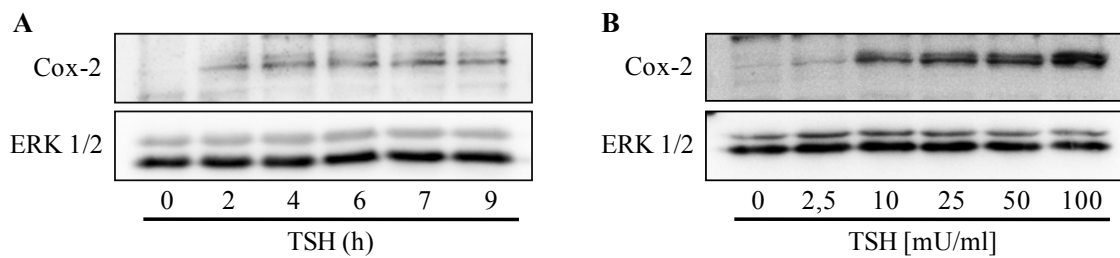


Abb. 5.57: Expression des Proteins Cox-2 in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit TSH
 (A) FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 0; 2; 4; 6; 7 oder 9 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. (B) FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 12 h mit den angegebenen TSH-Konzentrationen stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils einen Immunoblot für das Cox-2 Protein (oben) sowie das totale Protein ERK 1/2 als Ladekontrolle (unten).

Bei der Inkubation mit TSH für verschiedene Zeiträume zeigte sich eine Zeitabhängige Expression von Cox-2 (Abb. 5.57 A). Während bei unstimulierten FTC 133 wt TSH-R Zellen nahezu kein Cox-2 Protein nachgewiesen werden konnte, führte die Stimulation mit TSH für zwei Stunden zu einer schwachen Proteinbande in Höhe des Cox-2 Proteins. Im Zeitraum von vier bis neun Stunden wurde mehr Cox-2 Protein exprimiert, wobei das meiste Protein zwischen vier und sieben Stunden nach der Stimulation mit TSH nachgewiesen wurde. Die Inkubation mit verschiedenen TSH-Konzentrationen hatte einen Konzentrations-abhängigen Effekt (Abb. 5.57 B). Eine Konzentration von 10 mU/ml TSH war bereits ausreichend, um die Cox-2 Proteinexpression zu steigern, die Proteinbande bei der höchsten untersuchten Konzentration mit 100 mU/ml hatte die stärkste Intensität. Zusammengefasst konnte die TSH-induzierte mRNA-Expression von Cox-2 in FTC 133 wt TSH-R Zellen also auf Proteinebene bestätigt werden.

5.3.6.3 Analyse einer Calcineurin/NFAT-Aktivierung bei der TSH-induzierten Cox-2 Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Einfluss von Calcineurin-Inhibitoren auf die TSH-induzierte Cox-2 Expression

Im Anschluss sollte analysiert werden, ob die TSH-induzierte Expression von Cox-2 in FTC 133 wt TSH-R Zellen abhängig von Calcineurin und NFAT ist. Dafür wurden die Zellen vor und während ihrer Stimulation mit TSH mit den Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A (CsA) oder Tacrolimus (FK 506) inkubiert.

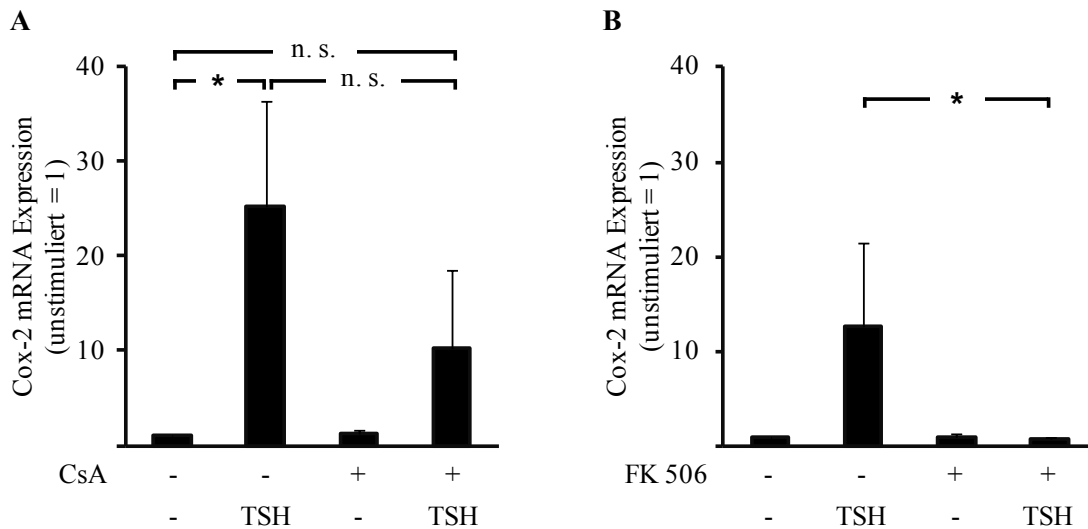


Abb. 5.58: Expression von Cox-2 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition von Calcineurin und Stimulation mit TSH

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 30 min mit (A) dem Inhibitor Cyclosporin A (CsA, 1 μ M) oder (B) dem Inhibitor Tacrolimus (FK 506, 50 nM) vorinkubiert und anschließend für 12 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. Die Expression von Cox-2 wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt und auf den Basalwert der Zellen normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (*: $p < 0,05$; n. s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)).

In Anwesenheit der Calcineurin-Inhibitoren konnte TSH die Cox-2 mRNA-Expression nicht mehr signifikant induzieren (Abb. 5.58). Im Ansatz mit CsA wurde die Cox-2 mRNA-Expression TSH-abhängig signifikant auf das 25,2-fache vom Basalwert erhöht. Nach zusätzlicher Vorinkubation mit CsA war die Cox-2 Expression nicht mehr signifikant gegenüber basal verändert. Nach der Inhibition von Calcineurin mit FK 506 wurde die TSH-induzierte Cox-2 Expression von dem 12,6-fachen auf das 0,7-fache gegenüber basal signifikant verringert. Die Inkubation mit den Inhibitoren alleine hatte keinen signifikanten Einfluss auf die basale Cox-2 mRNA-Expression. Aufgrund dieser Ergebnisse schien es wahrscheinlich, dass neben RCAN1 auch die TSH-vermittelte Cox-2 Expression abhängig von Calcineurin war. Die auf mRNA-Ebene beobachteten Effekte sollten im Anschluss jedoch zuerst auf Proteinebene überprüft werden.

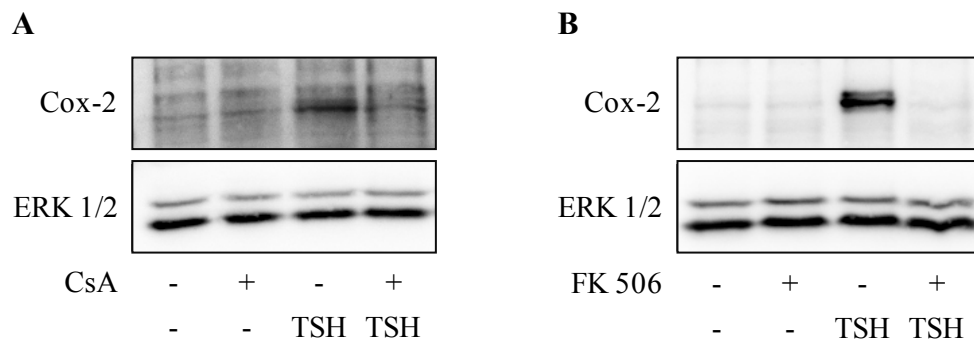


Abb. 5.59: Expression des Proteins Cox-2 in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition von Calcineurin und Stimulation mit TSH

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 30 min mit (A) dem Inhibitor Cyclosporin A (CsA, 1 μ M) oder (B) dem Inhibitor Tacrolimus (FK 506, 50 nM) vorinkubiert und anschließend für 12 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. Die Abbildungen zeigen einen Immunoblot für das Cox-2 Protein (oben) sowie das totale Protein ERK 1/2 als Ladekontrolle (unten).

CsA, aber ganz besonders FK 506 konnten die erhöhte Proteinexpression von Cox-2 nach einer Stimulation mit TSH blockieren (Abb. 5.59). Demnach war die TSH-induzierte Expression von Cox-2 in FTC 133 wt TSH-R Zellen abhängig von einer Aktivierung der Phosphatase Calcineurin.

Einfluss von INCA-6 auf die TSH-induzierte Cox-2 Expression

Da durch eine Abhängigkeit von Calcineurin jedoch nicht eindeutig auch eine Beteiligung von NFAT vorausgesetzt werden konnte, wurde diese gesondert überprüft. Dazu wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen vor ihrer TSH-Stimulation mit dem Inhibitor INCA-6 inkubiert, der selektiv die Aktivierung von NFAT durch Calcineurin blockiert.

Die TSH-induzierte Expression von Cox-2 wurde durch die Vorinkubation mit dem NFAT-Inhibitor INCA-6 auf mRNA- und Proteinebene beeinflusst, während der Inhibitor alleine keinen signifikanten Effekt auf den Basalwert aufzeigte (Abb. 5.60). Die mRNA-Expression der mit TSH-stimulierten Zellen war im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant auf das 19,1-fache erhöht, dagegen unterschieden sich die mit INCA-6 und TSH inkubierten Zellen statistisch nicht signifikant von basal (Abb. 5.60 A). Auf Proteinebene konnte die TSH-induzierte Expressionssteigerung von Cox-2 durch eine Vorinkubation mit INCA-6 nahezu vollständig blockiert werden (Abb. 5.60 B). Die Daten signalisierten, dass die TSH-vermittelte Cox-2 Induktion in FTC 133 wt TSH-R Zellen durch den Transkriptionsfaktor NFAT induziert wurde.

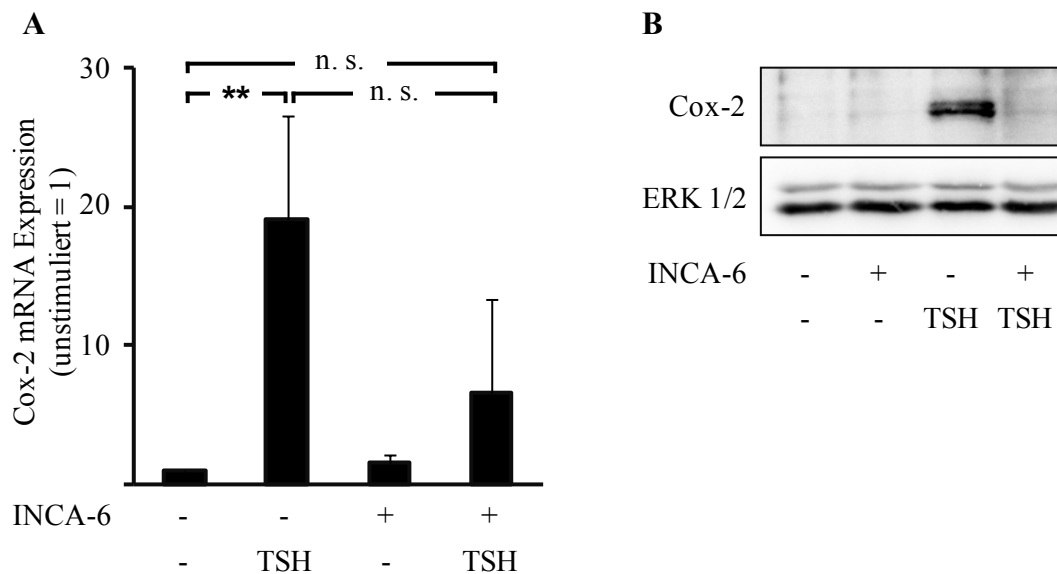


Abb. 5.60: Expression von Cox-2 mRNA und des Proteins Cox-2 in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition von NFAT und Stimulation mit TSH

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 30 min mit dem Inhibitor INCA-6 (5 μ M) vorinkubiert und anschließend für 12 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. (A) Die Expression von Cox-2 mRNA wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt und auf den Basalwert der Zellen normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (**: $p < 0,01$; n. s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)). (B) Die Abbildungen zeigen einen Immunoblot für das Cox-2 Protein (oben) sowie das totale Protein ERK 1/2 als Ladekontrolle (unten).

Zusammengenommen sprechen die in diesem Kapitel durchgeführten Versuche dafür, dass die TSH-induzierte Cox-2 Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen sowohl von Calcineurin als auch von NFAT abhängig war.

5.3.6.4 Rolle der G-Protein-Aktivierung bei der TSH-induzierten Cox-2 Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Einfluss von $G_{q/11}$ -Proteinen auf die TSH-induzierte Cox-2 Expression

Bei der NFAT-vermittelten Expression von RCAN1.4 in FTC 133 wt TSH-R Zellen wurde gezeigt, dass G_{α_q} - und $G_{\alpha_{11}}$ -Proteine an der Signaltransduktion beteiligt waren (siehe Abb. 5.28 und Abb. 5.30). Wenn die durch TSH induzierte Expression von Cox-2 durch NFAT bedingt war, sollte sie demnach ebenfalls abhängig von G_{α_q} und $G_{\alpha_{11}}$ sein. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen mit siRNA sowohl gegen G_{α_q} als auch gegen $G_{\alpha_{11}}$ transfiziert und anschließend mit TSH stimuliert.

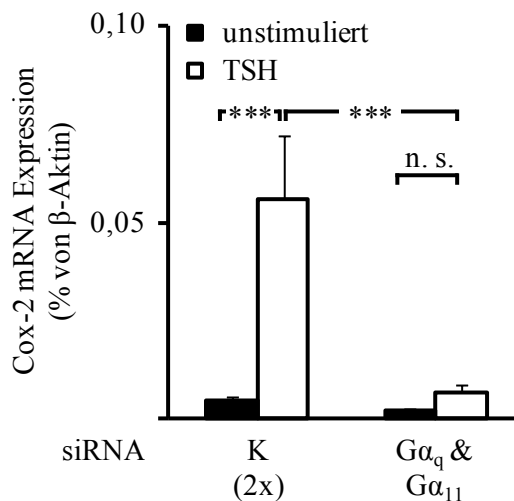


Abb. 5.61: Expression von Cox-2 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Doppeltransfektion mit siRNA gegen $G\alpha_q$ sowie $G\alpha_{11}$ und Stimulation mit TSH

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden mit der zweifachen Menge Kontroll-siRNA (K (2x)) oder mit siRNA gegen $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ transfiziert und 57 h später für 15 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. Die Expression von Cox-2 wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (***: $p < 0,001$; n. s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)).

Nach Herunterregulation von $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ mittels siRNA war die basale mRNA-Expression von Cox-2 in FTC 133 wt TSH-R Zellen im Vergleich zu unstimulierten, Kontroll-siRNA transfizierten Zellen statistisch nicht signifikant verändert (Abb. 5.61). Die TSH-induzierte Expression von Cox-2 mRNA war nach der Herunterregulation dagegen signifikant verringert, im Bezug auf Kontroll-siRNA transfizierte Zellen wurden hier nur noch etwa 12 % exprimiert. Die Stimulation mit TSH führte in Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert worden waren, zu einem signifikanten Anstieg der Cox-2 mRNA-Expression um etwa das 26-fache. Dagegen wurde in Zellen, die mit siRNA gegen $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ transfiziert worden waren, die Cox-2 mRNA-Expression durch TSH nicht signifikant erhöht. Damit konnte auf mRNA-Ebene eine Abhängigkeit von $G\alpha_q$ sowie $G\alpha_{11}$ bei der TSH-vermittelten Expression von Cox-2 gezeigt werden.

Um diesen Effekt auch auf Proteinebene zu bestätigen, wurde die Proteinexpression von Cox-2 nach einer Herunterregulation von $G\alpha_q$ sowie $G\alpha_{11}$ und einer folgenden Stimulation mit TSH analysiert. Zur Positivkontrolle für den Versuchsaufbau wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen neben TSH auch mit Ionomycin stimuliert.

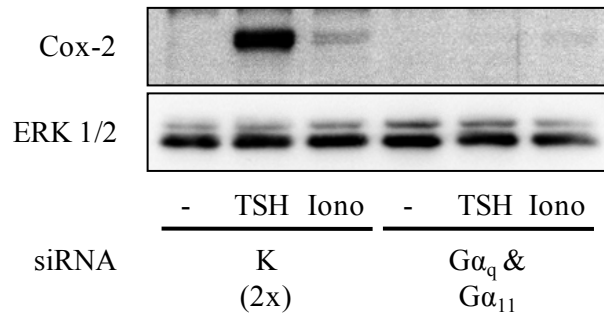


Abb. 5.62: Expression des Proteins Cox-2 in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Doppeltransfektion mit siRNA gegen $G\alpha_q$ sowie $G\alpha_{11}$ und Stimulation mit TSH oder Ionomycin

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden mit der zweifachen Menge Kontroll-siRNA (K (2x)) oder mit siRNA gegen $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ transfiziert und 57 h später für 15 h mit TSH (50 mU/ml) oder Ionomycin (Iono, 0,4 μ M) stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils einen Immunoblot für das Cox-2 Protein (oben) sowie das totale Protein ERK 1/2 als Ladekontrolle (unten).

Die Herunterregulation von $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ mittels spezifischen siRNAs führte dazu, dass nach einer Inkubation mit TSH kein Cox-2 Protein induziert werden konnte (Abb. 5.62). Nach einer Transfektion der Zellen mit Kontroll-siRNA wurde dagegen bei einer Stimulation mit TSH eine gesteigerte Expression des Proteins Cox-2 beobachtet. Diese Ergebnisse bestätigten die mRNA-Daten und wiesen darauf hin, dass die TSH-vermittelte Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen abhängig von der Aktivierung von $G\alpha_q$ sowie $G\alpha_{11}$ war.

5.3.6.5 Analyse von Cofaktoren für NFAT bei der TSH-induzierten Expression von Cox-2 in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Analyse einer direkten TSH-induzierten Cox-2 Expression

Im Folgenden sollte eine mögliche Beteiligung von neu synthetisierten Proteinen bei der TSH-vermittelten Cox-2 Induktion analysiert werden. Dafür wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen vor und während ihrer Stimulation mit Cycloheximid inkubiert, das die Gentranslation von Eukaryonten inhibiert.

In Anwesenheit von Cycloheximid führte die Stimulation mit TSH zu keiner verringerten Induktion der Cox-2 mRNA, demnach war die TSH-vermittelte Steigerung der Cox-2 Expression nicht abhängig von einer Neusynthese von Proteinen (Abb. 5.63). Dieses Ergebnis stand in Einklang mit der Theorie, dass Cox-2 durch NFAT induziert wird, da zur Aktivierung von bereits synthetisierten, inaktiven NFAT Proteinen keine Proteinsynthese nötig ist. Die Expression von Cox-2 mRNA wurde in Gegenwart von Cycloheximid sogar gesteigert: während nach einer Stimulation mit TSH die 20-fache Cox-2 mRNA Menge exprimiert wurde, konnte die zusätzliche Cycloheximid-Behandlung die 42-fache mRNA Menge induzieren. Die erhöhte mRNA-Expression

von Cox-2 nach Cycloheximid-Behandlung war nicht signifikant. Sie könnte jedoch dadurch verursacht worden sein, dass unter Inhibition der Gentranslation auch kein RCAN1 Protein mehr synthetisiert werden konnte, das als negativer Rückkopplungsmechanismus für die Calcineurin-Aktivierung dienen kann.

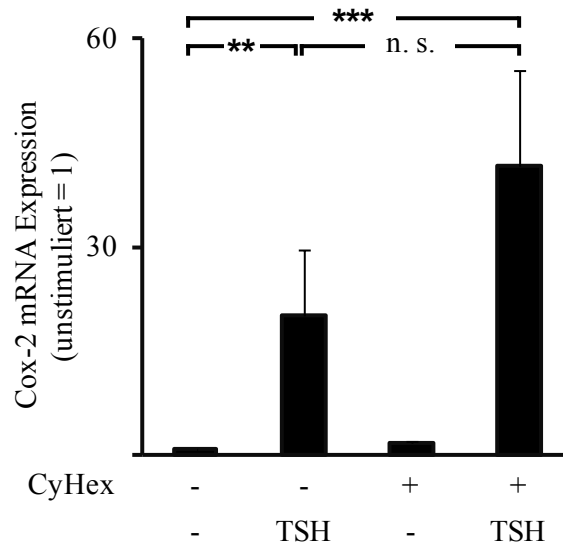


Abb. 5.63: Expression von Cox-2 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition der Gentranslation und Stimulation mit TSH

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 30 min mit dem Inhibitor Cycloheximid (CyHex, 25 μ M) vorinkubiert und anschließend für 12 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. Die Expression von Cox-2 wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt und auf den Basalwert der Zellen normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (**: $p < 0,01$; n. s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)).

5.4 TSH-induzierte MT1X Expression in follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien und primären Thyrozyten

Im Rahmen der Charakterisierung von $G\alpha_{q/11}$ -abhängigen Effektoren des TSH-R in humanen Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien sollte außerdem die TSH-induzierte Expression der Metallothionein (MT)-Variante 1X (MT1X) in FTC 133 wt TSH-R Zellen näher analysiert werden. Zusätzlich sollten in diesem Zusammenhang überprüft werden, ob eine Stimulation mit TSH auch in den primären Thyrozyten Zelllinien SD 171 und SD 197 MT1X induzieren kann. Ausgangspunkt dieser Untersuchungen waren Daten vorausgegangener Arbeiten von Nowak et. al sowie Bäck et. al, in denen die TSH-abhängige MT1X Expression erstmalig gezeigt worden war (Nowak 2005; Bäck 2009).

5.4.1 TSH-induzierte Expression von MT1X mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen

In der Arbeit von Bäck et. al konnte auf mRNA-Ebene gezeigt werden, dass MT1X durch TSH induziert wird (Bäck 2009). Um diesen Befund näher zu charakterisieren, wurde die Expression von MT1X mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach einer Stimulation mit verschiedenen TSH-Konzentrationen analysiert.

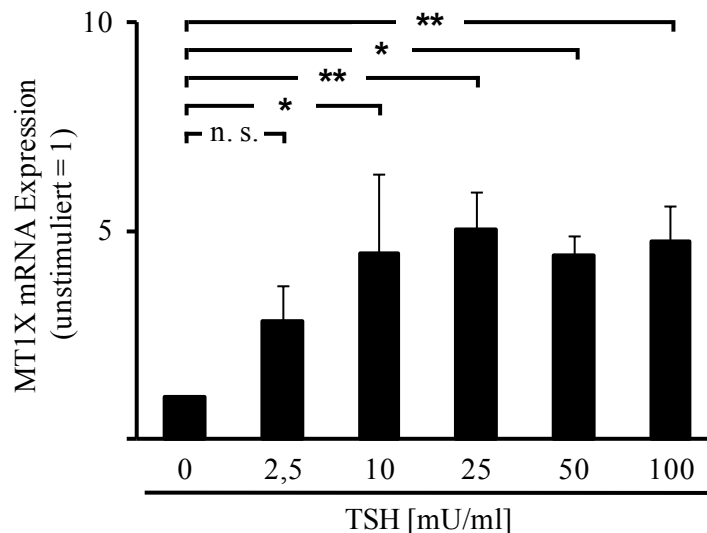


Abb. 5.64: Expression von MT1X mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit TSH
 FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 12 h mit den angegebenen TSH-Konzentrationen stimuliert. Die Expression von MT1X wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt und auf den Basalwert der Zellen normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; n. s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)).

Hierbei zeigte sich eine Konzentrations-abhängige Expression der MT1X mRNA (Abb. 5.64). Nach Inkubation mit der am niedrigsten dosierten TSH-Konzentration (2,5 mU/ml) wurde etwa die 3-fache Menge der basalen mRNA Menge exprimiert, allerdings war dieser Anstieg statistisch nicht signifikant. Ab einer Konzentration von 10 mU/ml konnte TSH die mRNA-Expression von MT1X signifikant steigern, hier wurde etwa die 4,5-fache Menge gegenüber dem Basalwert quantifiziert. Die höheren TSH-Konzentrationen (25; 50; 100 mU/ml) führten im Vergleich zu basal alle zu einer signifikant erhöhten MT1X mRNA-Expression, unterschieden sich jedoch statistisch nicht von der TSH-Stimulation mit einer Konzentration von 10 mU/ml. Demnach war eine TSH-Konzentration von 10 mU/ml bereits ausreichend, um die durch TSH maximal erreichbare mRNA-Expression von MT1X zu induzieren. Im Folgenden wurde eine TSH-Konzentration von 50 mU/ml für Stimulationen verwendet, um eine stabile Expression der MT1X mRNA sicherzustellen.

5.4.2 Untersuchungen zur Signaltransduktionskaskade der TSH-induzierten MT1X Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen

5.4.2.1 Rolle der $G_{q/11}$ -Protein-Aktivierung bei der TSH-induzierten MT1X Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen

In den Arbeiten von Nowak et. al und Bäck et. al wurde postuliert, dass die TSH-induzierte Expression von MT1X in FTC 133 wt TSH-R Zellen abhängig von $G_{q/11}$ -Proteinen ist. Daher sollte die Abhängigkeit des $G_{q/11}$ -Signalweges bei der TSH-induzierten Expression von MT1X in dieser Zelllinie überprüft werden. Dazu wurde die Expression der α -Untereinheiten von G_q und G_{11} mit Hilfe der bereits in 5.3.4.5 (siehe insbesondere Abb. 5.27) getesteten spezifischen siRNAs $G\alpha_q$ (II) und $G\alpha_{11}$ (II) herunterreguliert und die Zellen anschließend mit TSH stimuliert.

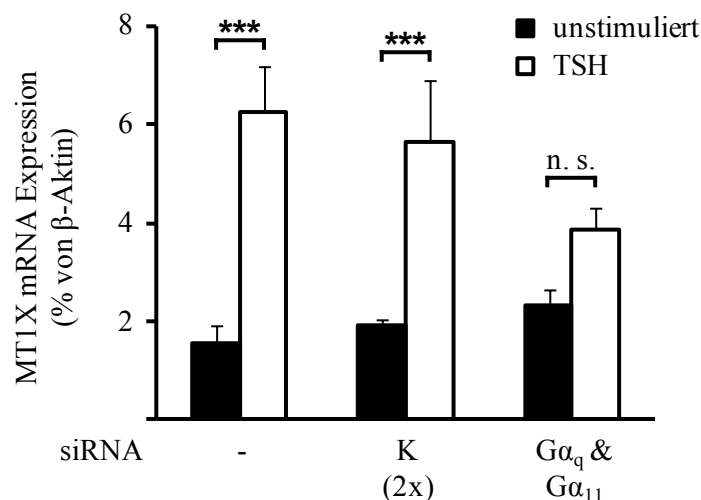


Abb. 5.65: Expression von MT1X mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Doppeltransfektion mit siRNA gegen $G\alpha_q$ sowie $G\alpha_{11}$ und Stimulation mit TSH

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden mit der zweifachen Menge Kontroll-siRNA (K (2x)) oder mit siRNA gegen $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ transfiziert und 57 h später für 15 h mit Ionomycin (Iono, 0,4 μ M) stimuliert. Die Expression von MT1X wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (***: $p < 0,001$; n. s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)).

Sowohl die basale als auch die TSH-induzierte MT1X Expression wurde durch die Transfektion von der zweifachen Menge Kontroll-siRNA nicht signifikant beeinflusst (Abb. 5.65bb. 5.65). In den mit Kontroll-siRNA transfizierten FTC 133 wt TSH-R Zellen konnte die Expression von MT1X mRNA durch TSH signifikant gesteigert werden, gegenüber dem Basalwert auf das 2,9-fache. Im Gegensatz dazu wurde der Basalwert in Zellen, die mit siRNA gegen $G\alpha_q$ sowie $G\alpha_{11}$ transfiziert worden waren, durch TSH um den Faktor 1,7 gesteigert, dieser Anstieg war

jedoch statistisch nicht signifikant. Demnach war die TSH-induzierte Expression von MT1X abhängig von G_{α_q} - und $G_{\alpha_{11}}$ -Proteinen.

Analyse der PKC-Aktivierung bei der TSH-induzierten MT1X Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Um den Mechanismus der TSH-induzierten Expression von MT1X näher zu analysieren, sollte als nächstes die Rolle von Calciumionen sowie der Proteinkinase C (PKC) überprüft werden, zwei klassischen Effektoren des $G_{q/11}$ -Signalweges. Dafür wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin oder dem Phorbol Ester Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), einem PKC-Aktivator, inkubiert.

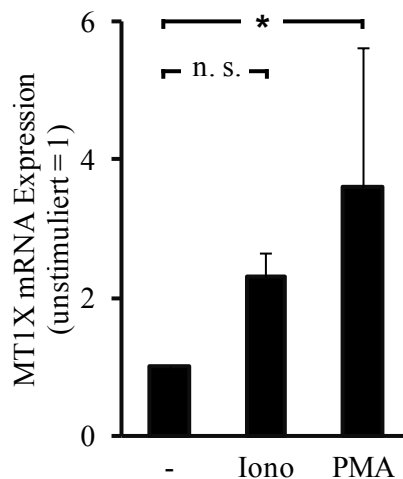


Abb. 5.66: Expression von MT1X mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit Ionomycin oder PMA

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 12 h mit Ionomycin (Iono, 0,4 μ M) oder PMA (10 μ M) stimuliert. Die Expression von MT1X wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt und auf den Basalwert der Zellen normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (*: $p < 0,05$; n. s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)).

Die Stimulation mit Ionomycin führte zu einem schwachen, statistisch jedoch nicht signifikanten Anstieg der mRNA-Expression von MT1X auf das etwa 2,3-fache des Basalwertes (Abb. 5.66). Dagegen konnte die Aktivierung der PKC durch PMA die Expression der MT1X mRNA signifikant steigern, hier wurde etwa das 3,6-fache von unbehandelten Zellen exprimiert. Die beobachteten Ergebnisse zeigten also, dass eine Aktivierung der PKC und evtl. auch eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ ausreichend war, um MT1X zu induzieren. Da diese Effektoren auch über den $G_{q/11}$ -abhängigen Signalweg aktiviert werden, wurde eine Beteiligung dieses Signalweges bei der TSH-induzierten Expression von MT1X weiter gefestigt.

Analyse anderer Calciumionen-mobilisierender Stimuli bei der MT1X Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Als nächstes sollte die Rolle von Calciumionen bei der MT1X Expression näher untersucht werden, da eine Stimulation der FTC 133 wt TSH-R Zellen mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin diese Expression nur gering und nicht signifikant steigern konnte, Calciumionen jedoch für die TSH-induzierte MT1X Expression essenziell sind (Bäck 2009). Dafür wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen mit ATP, Bradykinin (BK), Carbachol (CCh) oder Somatostatin (Sst) stimuliert und zuerst die $[Ca^{2+}]_i$ in Folge der Stimulation mit Hilfe von Fura-2 bestimmt. Diese Stimulanzien wurden ausgewählt, da sie unabhängig von dem TSH-R agieren und in vielen anderen Zellsystemen die $[Ca^{2+}]_i$ verändern können. In einem nächsten Schritt sollte dann der Effekt dieser Substanzen auf die MT1X Expression der FTC 133 wt TSH-R Zellen analysiert werden.

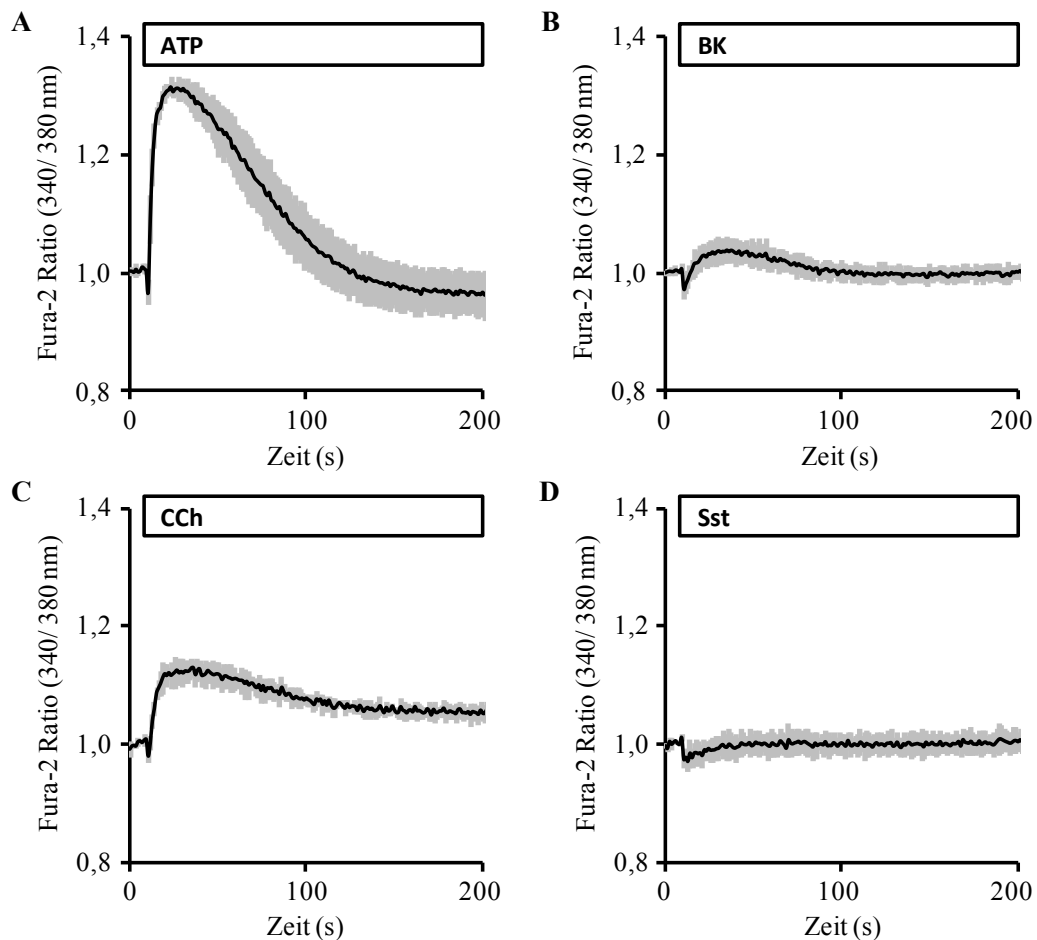


Abb. 5.67: Intrazelluläre Calciumionenkonzentration in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit ATP, Bradykinin, Carbachol oder Somatostatin

Mit Fura-2 beladene FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden nach 10 s mit (A) ATP (2 mM), (B) Bradykinin (BK, 1 μ M), (C) Carbachol (CCh, 100 μ M) oder (D) Somatostatin (Sst, 30 nM) stimuliert. Die Emission bei 510 nm wurde nach Anregung bei 340 nm und 380 nm über einen Zeitraum von 200 s alle 1,16 s gemessen. Abgebildet ist der normierte Quotient der Emission der beiden Wellenlängen gegen die Zeit. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

Nach der Stimulation von FTC 133 wt TSH-R Zellen mit ATP oder CCh kam es zu einer deutlichen Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ (Abb. 5.67 A und C). Dagegen führte die Stimulation mit BK nur zu einem sehr geringen Anstieg und Sst hatte keinen Effekt auf die $[Ca^{2+}]_i$ (Abb. 5.67 B und D).

Um den Effekt der verschiedenen Reagenzien auf die MT1X Expression zu untersuchen, wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen mit diesen stimuliert und anschließend die exprimierte MT1X mRNA quantifiziert.

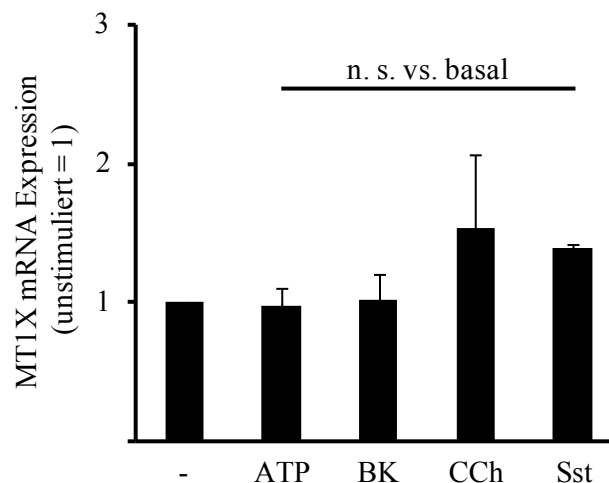


Abb. 5.68: Expression von MT1X mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit ATP, Bradykinin, Carbachol oder Somatostatin

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 12 h mit ATP (2 mM), Bradykinin (BK, 1 μ M), Carbachol (CCh, 100 μ M) oder Somatostatin (Sst, 30 nM) stimuliert. Die Expression von MT1X wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt und auf den Basalwert der Zellen normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (n. s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)).

Keiner der verwendeten Stimuli konnte die Expression der MT1X mRNA signifikant beeinflussen (Abb. 5.68). Diese Ergebnisse sprachen dafür, dass in FTC 133 wt TSH-R Zellen eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ alleine nicht ausreichend war, um die mRNA-Expression von MT1X zu steigern. Die induzierte Expression von MT1X schien damit in FTC 133 wt TSH-R Zellen sehr spezifisch für TSH zu sein und neben Calciumionen mussten noch andere Signalwege und Effektoren eine wichtige Rolle spielen.

5.4.2.2 Rolle der G_s -Protein-Aktivierung bei der TSH-induzierten MT1X Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Da neben $G_{q/11}$ -Proteinen auch andere G-Proteine an der TSH-induzierten Expression von MT1X beteiligt sein könnten, sollte zusätzlich eine Beteiligung des G_s - und somit des cAMP-abhängigen Signalwegs analysiert werden. Dafür wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen mit dem Adenylylcyclasen (AC)-Aktivator Forskolin (FSK) stimuliert, der eine Bildung von cAMP initiiert. Wenn die TSH-abhängige MT1X Induktion in FTC 133 wt TSH-R Zellen über das G-Protein G_s und somit auch über cAMP vermittelt wurde, sollte auch Forskolin die Expression von MT1X steigern können.

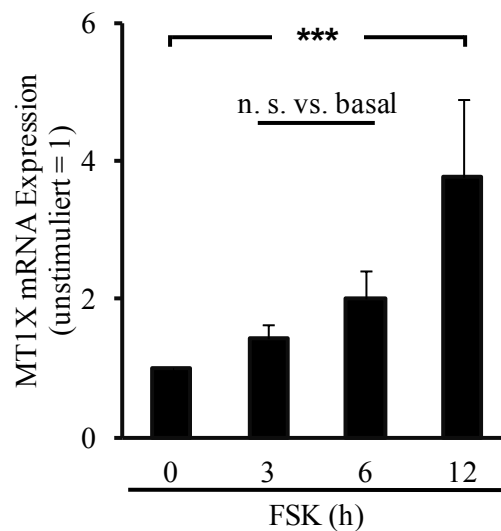


Abb. 5.69: Expression von MT1X mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit Forskolin

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 3; 6 oder 12 h mit Forskolin (FSK, 10 μ M) stimuliert. Die Expression von MT1X wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt und auf den Basalwert der Zellen normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (***: $p < 0,001$; n. s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)).

Die Stimulation mit FSK führte zu einem Zeit-abhängigen Anstieg der MT1X mRNA-Expression (Abb. 5.69). Nach drei und sechs Stunden wurde das 1,4- bzw. 2-fache des Basalwertes exprimiert, allerdings war diese Steigerung statistisch nicht signifikant. Erst nach einer Inkubation mit FSK für 12 Stunden war die MT1X mRNA-Expression signifikant gegenüber unstimulierten FTC 133 wt TSH-R Zellen um etwa das 3,8-fache erhöht. Demnach konnte durch die Aktivierung von AC über die Erhöhung des cAMP-Spiegels in FTC 133 wt TSH-R Zellen eine Induktion von MT1X initiiert werden. Ob auch eine TSH-abhängige cAMP-Bildung zur gesteigerten Expression von MT1X mRNA beitragen konnte, sollte als nächstes analysiert werden.

Dazu wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen mit Rp-cAMPS, einem Inhibitor der Proteinkinase A (PKA), vorinkubiert und anschließend mit TSH stimuliert. Um die PKA TSH-unabhängig zu stimulieren, wurden die Zellen außerdem nach der Vorinkubation mit Rp-cAMPS mit FSK stimuliert.

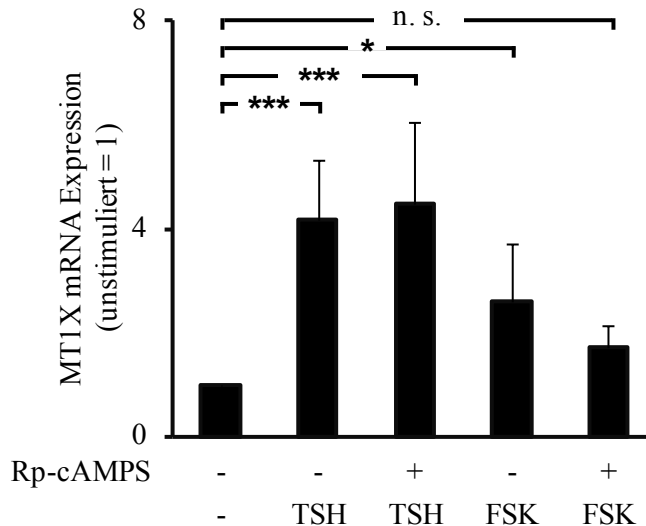


Abb. 5.70: Expression von MT1X mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition der Proteinkinase A und Stimulation mit TSH oder Forskolin

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 30 min mit dem Inhibitor Rp-cAMPS (20 μ M) vorinkubiert und anschließend für 12 h mit TSH (50 mU/ml) oder Forskolin (FSK, 10 μ M) stimuliert. Die Expression von MT1X wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt und auf den Basalwert der Zellen normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$; n. s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)).

Die durch TSH auf das 4,2-fache gesteigerte Expression von MT1X wurde durch Rp-cAMPS nicht signifikant beeinflusst und auch in Anwesenheit des Inhibitors erhöhte TSH die Expression von MT1X mRNA signifikant (Abb. 5.70). Dagegen konnte FSK nach Vorinkubation mit dem Inhibitor den Basalwert nicht signifikant verändern, während die Stimulation mit FSK alleine zu einer 2,6-fachen Expression über basal von MT1X mRNA führte. Dieses Ergebnis belegte zum einen die generelle Wirksamkeit des Inhibitors, zum anderen zeigte es, dass nur die FSK-induzierte MT1X Expression abhängig von der PKA war, die TSH-induzierte MT1X Expression war dagegen PKA-unabhängig und daher auch unabhängig von cAMP.

5.4.2.3 Analyse einer MAPK-Aktivierung bei der TSH-induzierten MT1X Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Als nächstes sollte analysiert werden, ob die Aktivierung von ERK 1/2 in die TSH-induzierte Expression von MT1X involviert war, denn für die Cadmiumionen-induzierten Metallothionein Expression in Schilddrüsenkarzinomzellen ist zusätzlich zu Calciumionen auch eine Aktivierung von ERK nötig (Liu et al. 2007; Liu et al. 2009). Um dies zu überprüfen, wurden FTC 133 wt TSH-R Zellen mit dem bereits unter 5.3.3.2 beschriebenen MEK-Inhibitor U0126 vorinkubiert und anschließend mit TSH stimuliert.

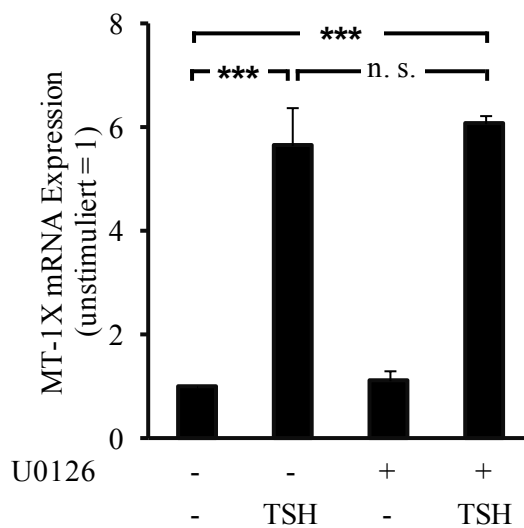


Abb. 5.71: Expression von MT1X mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition von MEK und Stimulation mit TSH

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurden für 30 min mit dem Inhibitor U0126 (5 μ M) vorinkubiert und anschließend für 12 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. Die Expression von MT1X wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt und auf den Basalwert der Zellen normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (***: $p < 0,001$; n. s.: nicht signifikant ($p > 0,05$)).

Die Inkubation mit U0126 alleine hatte keinen signifikanten Einfluss auf die basale MT1X mRNA-Expression (Abb. 5.71). Auch nach einer Stimulation mit TSH wurde trotz der Inhibition von MEK keine signifikante Veränderung in der mRNA-Expression beobachtet und unter beiden Bedingungen konnte TSH die MT1X mRNA signifikant induzieren. Demnach war die Aktivierung von ERK 1/2 nicht nötig für die TSH-abhängige Expression von MT1X in FTC 133 wt TSH-R Zellen und unterschied sich daher von der Cadmiumionen-induzierten Metallothionein Expression in Schilddrüsenkarzinomzellen.

5.4.3 TSH-induzierte Expression von MT1X mRNA in primären Thyreozyten

Da es sich bei den FTC 133 wt TSH-R Zellen um ein Überexpressionssystem handelt, sollte die TSH-induzierte Expression von MT1X mRNA in einem Zellsystem mit endogenem TSH-R reproduziert werden. In den Befunden von Bäck et al. wurde hierzu bereits die Expression von MT1X Protein in der primären Thyreozyten-Zelllinie SD 191 gezeigt (Bäck 2009). Um zu analysieren, ob auch in anderen primären Thyreozyten-Zelllinien MT1X induziert wird, wurden SD 197 und SD 171 Zellen mit TSH sowie Ionomycin stimuliert.

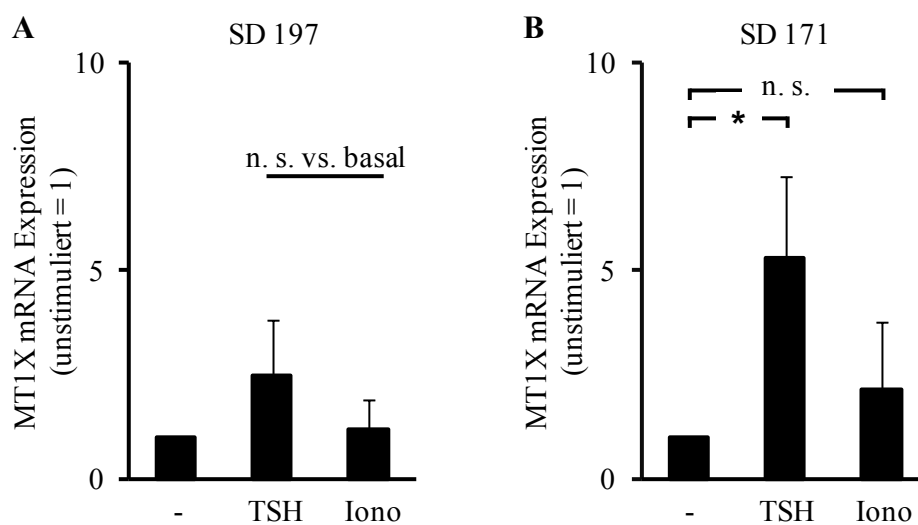


Abb. 5.72: Expression von MT1X mRNA in primären Thyreozyten nach Stimulation mit TSH oder Ionomycin

(A) SD 197 Zellen oder (B) SD 171 Zellen wurden für 12 h mit TSH (50 mU/ml) oder Ionomycin (Iono, 0,4 μ M) stimuliert. Die Expression von MT1X wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt und auf den Basalwert der Zellen normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (*: $p < 0,05$).

In SD 197 Zellen führte die Stimulation mit TSH zu einem etwa 2,5-fachen Anstieg der MT1X mRNA-Expression, allerdings unterschied sich dieser Wert statistisch nicht vom Basalwert und auch Ionomycin konnte den Basalwert nicht signifikant verändern (Abb. 5.72 A). Nach der TSH-Stimulation der SD 171 Zellen dagegen war die Expression der MT1X mRNA statistisch signifikant gegenüber dem Basalwert erhöht, hier wurde im Durchschnitt die 5,3-fache Menge im Vergleich zu unbehandelten Zellen nachgewiesen (Abb. 5.72 B). Ähnlich wie in FTC 133 wt TSH-R und SD 197 Zellen konnte jedoch auch in SD 171 Zellen keine signifikant erhöhte MT1X mRNA-Expression durch Ionomycin beobachtet werden.

5.4.3.1 Rolle der PKC bei der TSH-induzierten MT1X Expression in primären Thyreozyten

In den Befunden von Bäck et al. wurde für FTC 133 wt TSH-R Zellen sowie die primäre Thyreozyten-Zelllinie SD 191 gezeigt, dass die MT1X Induktion durch TSH abhängig von der Proteinkinase C (PKC) ist, welche einen klassischen Effektor des $G_{q/11}$ -Signalweges darstellt. In diesen Experimenten wurden die Zellen vor und während ihrer TSH-Stimulation mit Bisindolylmaleinimid II (BIM II) inkubiert, das PKC potent und spezifisch inhibiert. Um auch in SD 171 Zellen eine PKC-abhängige MT1X Expression zu überprüfen, wurden die Zellen daher vor und während ihrer Stimulation mit TSH mit dem Inhibitor Bisindolylmaleinimid X (BIM X) inkubiert, der die PKC ebenfalls potent und spezifisch inhibiert.

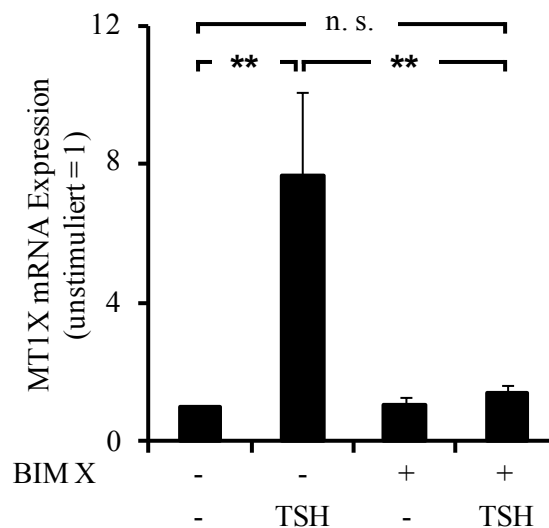


Abb. 5.73: Expression von MT1X mRNA in SD 171 Zellen unter Inhibition der Proteinkinase C und Stimulation mit TSH

SD 171 Zellen wurden für 30 min mit dem Inhibitor Bisindolylmaleinimid X (BIM X, 10 μ M) vorinkubiert und anschließend für 12 h mit TSH (50 mU/ml) stimuliert. Die Expression von MT1X wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR mit β -Aktin als Referenz bestimmt und auf den Basalwert der Zellen normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey (**: $p < 0,01$).

Die Vorinkubation mit dem Inhibitor konnte die TSH-abhängige MT1X mRNA-Expression signifikant von dem 7,7-fachen über basal auf das 1,4-fache des Basalwertes vermindern und so fast vollständig inhibieren (Abb. 5.73). Die mit BIM X und TSH inkubierten SD 171 Zellen unterschieden sich nicht signifikant von basal und auch auf die basale Expression der MT1X mRNA hatte BIM X keinen Einfluss. Dieser Befund zeigte, dass in der primären Thyreozyten Zelllinie SD 171 die TSH-induzierte Expression von MT1X abhängig von der PKC war.

6 Diskussion

6.1 $G_{q/11}$ -abhängige Signalwege des humanen TSH-R

Der humane TSH-R kann die G-Proteine aller vier Familien (G_s , $G_{q/11}$, $G_{i/o}$ und $G_{12/13}$) aktivieren (Allgeier et al. 1994; Laugwitz et al. 1996). Dabei werden über die Aktivierung von G_s und einer folgenden Erhöhung des cAMP-Spiegels vermutlich die meisten biologischen Effekte des TSH-R vermittelt (Vassart et al. 1992). Zur Rolle $G_{q/11}$ -abhängiger Signalwege des humanen TSH-R ist dagegen erst wenig bekannt. Die Aktivierung $G_{q/11}$ -abhängiger Signalwege in intakten Schilddrüsenzellen wurde zeitweise sogar angezweifelt, da in Schilddrüsenmembranen von Hunden nach der Stimulation mit TSH weder eine IP_3 -Bildung noch ein Calciumionenefflux aus internen Speichern beobachtet werden konnte (Allgeier et al. 1997). Dies stand im Gegensatz zu früher gezeigten Studien, in denen die Stimulation humaner Schilddrüsen mit TSH zu einer cAMP-Bildung sowie einer IP_3 -Bildung und Aktivierung der PLC führte (Laurent et al. 1987). Später konnte gezeigt werden, dass der TSH-R in vielen Spezies, darunter Mensch und Maus, $G_{q/11}$ aktiviert und es folglich zu einer IP_3 -Bildung kommt, während die Aktivierung des TSH-R von Hunden trotz einer Kopplung an $G_{q/11}$ keine IP_3 -Bildung hervorruft (Song et al. 2010). Außerdem wurde die Relevanz des $G_{q/11}$ -Signalweges bisher oftmals kritisch betrachtet, da zu dessen Aktivierung im Vergleich zu G_s höhere TSH-Konzentrationen nötig sind (Laurent et al. 1987; Yanagita et al. 1996). Ein möglicher Grund für diesen Unterschied konnte kürzlich aufgedeckt werden, denn für die Aktivierung von G_s -Proteinen und cAMP-Produktion war die Bindung von einem TSH-Molekül an das TSH-R-Dimer ausreichend, während für die Aktivierung von $G_{q/11}$ -Proteinen zwei TSH-Moleküle an das TSH-R-Dimer gebunden sein mussten (Allen et al. 2011). Dabei wies eine Bindungsstelle eine hohe Affinität für TSH auf, die andere hatte dagegen nur eine geringe Affinität für TSH (Allen et al. 2011). Auf Einzelzellebene konnte gezeigt werden, dass physiologische TSH-Konzentrationen ausreichen, um die intrazelluläre Calciumionenkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ in humanen Schilddrüsenzellen zu erhöhen (D'Arcangelo et al. 1995). Die physiologische Relevanz einer $G_{q/11}$ -Aktivierung wird darüber hinaus durch verschiedene Studien bestätigt: bei einer Thyrozyten-spezifischen Deletion von $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ in Mäusen kam es zwar zunächst zu einer normalen Entwicklung der Schilddrüse, nach einer Behandlung mit TSH konnte jedoch nur in Wildtyp Mäusen eine Steigerung der Zellzahl und Zellgröße beobachtet werden und viele Mäuse mit $G\alpha_{q/11}$ -Deletion entwickelten eine Hypothyreose (Kero et al. 2007). Auch die Schilddrüsenhormonsekretion als Antwort auf TSH war in diesen Mäusen reduziert (Kero et al. 2007). Die Ergebnisse legen nahe, dass

der $G_{q/11}$ -vermittelte Signalweg eine Rolle bei der TSH-regulierten Proliferation von Thyreozyten und auch bei der Hormonsynthese und/oder -freisetzung spielt. Allerdings wurde nicht ausgeschlossen, dass die allgemeine $G\alpha_{q/11}$ -Insuffizienz der Thyreozyten und nicht $G_{q/11}$ -vermittelte Signalwege des TSH-R dafür verantwortlich waren. Zwei verschiedenen Studien von Grasberger et al. sowie Calebrio et al. lieferten weitere Hinweise auf eine Beteiligung $G_{q/11}$ -abhängiger Signalwege des TSH-R bei der Schilddrüsenhormonsynthese. Grasberger et al. untersuchten eine Familie mit einer Mutation im *TSH-R*-Gen, bei der die Effizienz der IP_3 -Bildung nach TSH-Stimulation deutlich herabgesetzt war (Grasberger et al. 2007). Die Betroffenen hatten eine Hyperthyreotropinanämie (erhöhter Serum-TSH-Wert bei normalem Schilddrüsenhormonspiegel) und zeigten eine erhöhte Iodidaufnahme bei normaler Schilddrüsenfunktion und -größe (Grasberger et al. 2007). Die Autoren interpretierten ihre Daten dahingehend, dass die verringerte IP_3 -Bildung für eine verringerte Hormonsynthese verantwortlich war und durch gesteigerte Iodidaufnahme und Serum TSH-Level, also durch einen überaktiven G_s -Signalweg, kompensiert wurde (Grasberger et al. 2007). Ähnliches wurde in der Studie von Calebrio et al. beobachtet, die Patienten mit nicht-autoimmuner Hyperthyreotropinanämie untersuchten. Hier wurden in einigen Patienten heterozygote Mutationen entdeckt, die ausschließlich einen Funktionsverlust des $G_{q/11}$ -abhängigen Signalwegs des TSH-R hervorriefen (Calebrio et al. 2012). Auch für die von Kero et al. beobachtete, mögliche TSH-abhängige Proliferation über $G_{q/11}$ gibt es *in vivo* weitere Hinweise beim Menschen: kürzlich konnte an einem Patienten eine heterozygote Mutation im *TSH-R*-Gen gezeigt werden, die zu einer konstitutiven Aktivierung des G_s -Signalweges geführt hatte, während der $G_{q/11}$ -Signalweg inhibiert worden war (Winkler et al. 2010). Dieser Patient hatte keinen Kropf entwickelt, wie es bei einer konstitutiven Aktivierung des G_s -Proteins in Schilddrüsenepithelzellen sonst üblich ist (Winkler et al. 2010). Dieser Befund legt nahe, dass das Wachstum von Schilddrüsenzellen nicht ausschließlich durch G_s -vermittelte Signalwege reguliert wird, sondern auch die Aktivierung $G_{q/11}$ -abhängiger Signalwege involviert ist.

Verschiedene Befunde deuten außerdem darauf hin, dass $G_{q/11}$ -abhängige Signalwege des TSH-R und eine folgende Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und Proteinkinase C (PKC) in maligne Prozesse involviert sein könnten, denn über eine Aktivierung dieser Signalkaskade konnte TSH die Adhäsion, Migration und Invasion von Schilddrüsenkarzinomzellen erhöhen (Hoelting et al. 1993; Hoelting et al. 1994; Zielke et al. 1999). In diesem Zusammenhang erscheint besonders interessant, dass die Stimulation der PKC von Thyreozyten *in vitro* zu einer Proliferation und Dedifferenzierung der Zellen führte (Gallo et al. 1992; Portella et al. 1998). In einem Mausmodell mit einer konstitutiv aktiven Mutante des α_{1B} -adrenergen Rezeptors, in

dem sowohl die cAMP-Signalkaskade als auch die der PLC konstitutiv aktiv waren, war die maligne Transformation der Thyreozyten deutlich schneller als in einem Mausmodell, in dem nur die cAMP-Kaskade konstitutiv aktiviert war (Ledent et al. 1997). Außerdem konnten *in vivo* bereits erhöhte Aktivitäten der PLC und PKC in humanen Schilddrüsenkarzinomen gefunden werden (Kobayashi et al. 1993).

Trotz dieser Hinweise, dass $G_{q/11}$ -abhängige Signalwege des humanen TSH-R eine wichtige Rolle für die Physiologie und möglicherweise auch für die Pathophysiologie der Schilddrüse spielen, waren distale Effektoren dieses Signalweges bisher weitgehend unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden molekulare Effektoren des $G_{q/11}$ -abhängigen Signalweges des humanen TSH-R identifiziert und charakterisiert. Unter anderem wurde die TSH-abhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT beschrieben. Diese führte zu einer Genexpression von RCAN1.4 und Cox-2, die neben NFAT von $G_{q/11}$ -Proteinen, der $[Ca^{2+}]_i$ und Calcineurin abhängig war. Außerdem wurde die TSH-vermittelte Expression der Metallothionein (MT)-Variante MT1X als $G_{q/11}$ -induziertes Zielgen charakterisiert.

6.2 Auswahl der Zellmodelle

Um $G_{q/11}$ -abhängige Signalwege des humanen TSH-R zu analysieren, sollte ein geeignetes Zellmodell verwendet werden. Dieses musste vor allem zwei wesentliche Anforderungen erfüllen: zum einen sollten humane thyreoidale Zellen analysiert werden, zum anderen mussten diese einen TSH-R exprimieren, der nach seiner Stimulation den $G_{q/11}$ -abhängigen Signalweg aktivierte. Die Verwendung eines humanen Zellsystems war erforderlich, da die TSH-R anderer Spezies (vor allem der des Hundes) bereits abweichende Eigenschaften von dem humanen TSH-R gezeigt haben (Song et al. 2010). Der TSH-R der Ratten-Schilddrüsenzelllinie FRTL-5, die für Untersuchungen des TSH-R oftmals verwendet wird, aktiviert für dieselben physiologischen Effekte teilweise andere Signalkaskaden als der humane TSH-R (Song et al. 2010) und die TSH-R-abhängige Aktivierung der PLC wird in dieser Zelllinie sogar in Frage gestellt (Singh et al. 1996).

Die für die meisten Untersuchungen verwendete permanente follikuläre Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie FTC 133 wt TSH-R erfüllte diese Anforderungen. Die Überexpression des TSH-R versprach zudem, dass sich Rezeptor-abhängige Signalwege leichter untersuchen lassen, da diese in stärkerem Ausmaß aktiviert und so besser nachgewiesen werden können. Zur Verifikation der Ergebnisse sollte ein Zellmodell mit endogenem TSH-R verwendet werden, das den oben genannten Anforderungen entsprach. Idealerweise sollte es in Einklang mit den FTC 133 wt TSH-R Zellen einen

Ursprung aus follikulärem Schilddrüsenkarzinom haben. Außerdem wurden primäre humane Thyreozyten zur Verifikation der Ergebnisse analysiert (Zelllinien SD 171 und SD 197), die aus Schilddrüsengewebe von Patienten mit Morbus Basedow isoliert worden waren (Bäck et al. 2013). Diese konnten jedoch nur für ausgewählte Experimente verwendet werden, da ihre Zellzahl begrenzt war.

Eine follikuläre Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie zu verwenden, die den genannten Anforderungen entsprach, stellte ein Problem dar. Denn kommerziell erhältliche, immortalisierte Schilddrüsenzelllinien zeigen einen dedifferenzierten Phänotyp (van Staveren et al. 2007; Saiselet et al. 2012) und reagieren nicht auf TSH (van Staveren et al. 2007). Daher wurden zuerst mehrere kommerziell erhältliche follikuläre Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien auf die funktionelle Expression eines TSH-R analysiert. Zum einen wurden Zelllinien getestet, deren TSH-R Expression bisher nicht analysiert worden war, dies entsprach den Zelllinien CGTH-W-1 und TT2609 C02. Zum anderen wurden follikuläre Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien ausgewählt, in denen es Hinweise für eine TSH-R Expression gab. Dies waren die Zelllinien HTC 238 (Hoelting et al. 1995), ML-1 (Prante et al. 2009) und RO82-W-1 (Estour et al. 1989; Chen et al. 2000; Xing et al. 2003), die auch unter dem Namen WRO-Zellen bekannt sind.

Aufschluss zur funktionellen TSH-R Expression in den follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien sollte die Analyse der TSH-abhängigen ERK 1/2-Aktivierung geben. Hier reagierten neben FTC 133 wt TSH-R Zellen auch die Zelllinien HTC 238 und ML-1, daher exprimierten diese offenbar funktionellen TSH-R (Abb. 5.2). Eine ausbleibende ERK 1/2-Phosphorylierung nach TSH-Stimulation war jedoch kein zwingender Beweis für eine fehlende Expression des TSH-R. Da in RO82-W-1 Zellen auch die Positivkontrolle FCS den Phosphorylierungsstatus von ERK 1/2 nur wenig beeinflussen konnte, und Hinweise in der Literatur existieren, dass diese Zelllinie den TSH-R exprimiert, wurden neben den drei positiv getesteten Zelllinien auch RO82-W-1 Zellen in weiterführende Experimente eingeschlossen. In diesen wurde die TSH-abhängige Aktivierung der $G_{q/11}$ -Proteine mithilfe einer Bestimmung der intrazellulären Calciumionenkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) überprüft. Die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in allen vier Zelllinien, die als klassischer Effekt des $G_{q/11}$ -vermittelten Signalwegs gilt, deutete auf eine TSH-R Expression mit $G_{q/11}$ -Aktivierung hin (Abb. 5.3). Allerdings war diese in HTC 238 und ML-1 Zellen nur gering: in HTC 238 Zellen konnte nur eine Verdreifachung der Zellzahl eine schwache Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ herbeiführen und der Kurvenverlauf der TSH-stimulierten ML-1 Zellen lag zwar überhalb der Pufferkontrolle, der Unterschied war aber nicht signifikant. Die FTC 133 wt TSH-R und RO82-W-1 Zellen reagierten dagegen deutlich auf den

Stimulus TSH, wobei die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in RO82-W-1 Zellen stärker, jedoch transient war. Sie wurden als einzige Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie ausgewählt, um die Ergebnisse der FTC 133 wt TSH-R Zellen zu $G_{q/11}$ -abhängigen Signalwege des TSH-R in einem endogenen Zellsystem zu reproduzieren.

Ein Vergleich der TSH-R Expression in RO82-W-1 Zellen mit der in FTC 133 wt TSH-R und den anderen Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien ergab, dass im Gegensatz zu FTC 133 wt TSH-R Zellen, die etwa 2 % TSH-R mRNA bezogen auf β -Aktin exprimierten, bei RO82-W-1 Zellen kein spezifisches PCR-Produkt nachgewiesen werden konnte (Abb. 5.55). Da die Funktionalität des angewandten Primers in den FTC 133 wt TSH-R Zellen sowie in HTC 238 und ML-1 Zellen, die den TSH-R nicht überexprimieren, demonstriert werden konnte und außerdem spezifisch für alle drei Isoformen des Rezeptors gewählt worden war, konnte dieses Ergebnis nur dahingehend interpretiert werden, dass der TSH-R in RO82-W-1 Zellen nicht exprimiert wurde. Ausgeschlossen wurde auch, dass der TSH-R zum Zeitpunkt der Bestimmung der $[Ca^{2+}]_i$ sowie der TSH-abhängigen Expression von RCAN1.4 noch exprimiert wurde, da die mRNA Proben, in denen der TSH-R quantifiziert wurde, teilweise aus der gleichen Serie stammten, in der die Zellen TSH-abhängig RCAN1.4 exprimierten. Die Ergebnisse stehen im Einklang zu Befunden von van Staveren et al., die im Gegensatz zu Chen et al. (Chen et al. 2000) in RO82-W-1 Zellen keine Expression des TSH-R auf mRNA-Ebene nachweisen konnten und nach einer TSH-Stimulation der Zellen keine cAMP-Bildung beobachteten (van Staveren et al. 2007).

Aufgrund der fehlenden mRNA Expression des TSH-R handelte es sich bei der TSH-abhängigen Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in RO82-W-1 Zellen höchstwahrscheinlich um einen unspezifischen TSH Effekt und nicht um einen TSH-R-vermittelten Signalweg. Gleiches galt für alle anderen Versuche, in denen TSH ein Signal in diesen Zellen hervorrief. Unspezifische Effekte von kommerziell erhältlichem TSH wurden bereits im Jahr 2000 von Corrèze et al. beschrieben (Corrèze et al. 2000). Hier führte die Stimulation von verschiedenen Zelllinien unabhängig von ihrer TSH-R Expression zu einer Phosphorylierung von ERK 1/2. Da diese PKC-abhängig war, könnte TSH in diesen Zelllinien unabhängig vom TSH-R $G_{q/11}$ -Proteine aktiviert haben, die dann über die Stimulation der PKC die Phosphorylierung von ERK 1/2 bedingten. Die TSH-vermittelte Expression von RCAN1 in den RO82-W-1 Zellen wurde durch den $G_{q/11}$ -Signalweg induziert (Abb. 5.52), es könnten also ähnliche Faktoren wie in der Arbeit von Corrèze et al. zu den TSH-R-unabhängigen Effekten geführt haben. Hier wurde vermutet, dass das TSH mit Wachstumsfaktoren oder anderen, unbekannten Faktoren kontaminiert war. Die TSH-R-unabhängige Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, die durch eine abweichende Kinetik gekennzeichnet war (keine Plateauphase), und eine folgende

Expression von RCAN1.4 wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich in der Zelllinie RO82-W-1 beobachtet. In den Zelllinien FTC 133 wt TSH-R, HTC 238 und ML-1 erreichte die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ eine Plateauphase, und nach einer TSH-Stimulation korrelierte die maximale $[Ca^{2+}]_i$ in den Zellen mit der Menge der TSH-R mRNA Expression.

Obwohl die RO82-W-1 Zellen ursprünglich aus neoplastischem Schilddrüsengewebe isoliert wurden, gibt es Zweifel am genetischen Ursprung der Zellen. In einer genetischen Profilerstellung von Schilddrüsenkarzinomzellen wurden RO82-W-1 Zellen zwar als Zellen eines follikulären Schilddrüsenkarzinoms eingeordnet (Schweppe et al. 2008), in einer späteren Publikation stattdessen jedoch anhand von sogenannten "short tandem repeats" (kurze, hintereinander auftretende Wiederholungen) als Subklon der Kolonkarzinomzelllinie HT29 identifiziert (Espinosa et al. 2009). Möglicherweise kann der abweichende genetische Ursprung der Zellen ein Grund für die gegensätzlichen Eigenschaften der RO82-W-1 Zellen auf den Stimulus TSH sein. Dennoch sollte eine Verunreinigung in dem kommerziell erworbenen TSH die Effekte von TSH auf die RO82-W-1 Zellen ausgelöst haben. Da Kolonkarzinomzellen jedoch andere Rezeptoren als Schilddrüsenkarzinomzellen exprimieren, könnte dies erklären, warum ausschließlich in den RO82-W-1 Zellen eine unspezifische TSH-abhängige Reaktion der Zellen beobachtet wurde.

Für $G_{q/11}$ -vermittelte Effekte des humanen TSH-R wurden die Ergebnisse der Zelllinie RO82-W-1 nicht weiter berücksichtigt und, falls nicht anders vermerkt, gelten die diskutierten Ergebnisse im engeren Sinn für die Zelllinie FTC 133 wt TSH-R.

6.3 TSH-vermittelte NFAT-Aktivierung

6.3.1 Expression des Transkriptionsfaktors NFAT sowie dessen TSH-abhängige Aktivierung in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Der Transkriptionsfaktor NFAT, ursprünglich identifiziert als induzierbarer nukleärer Faktor, der den *Interleukin 2 (IL-2)*-Promoter in aktivierten T-Zellen binden kann (Shaw et al. 1988), ist auch in Zellen außerhalb des Immunsystems aktiv. In den letzten Jahre wurde die Bedeutung des Transkriptionsfaktors bei der Pathogenese von malignen Erkrankungen, der Tumorprogression sowie der Metastasierung deutlich (Mancini et al. 2009; Müller et al. 2010). Beim Mammakarzinom fördert NFAT die Invasion und trägt so zur Metastasierung bei (Yiu et al. 2006; Yiu et al. 2011; Gaudineau et al. 2012), im Pankreaskarzinom wird NFAT überexprimiert und seine Aktivierung verursacht ein Wachstum der Krebszellen (Buchholz et al. 2006; Koenig et

al. 2010). Darüber hinaus ist eine Rolle des Transkriptionsfaktors im metastatischen Melanom (Flockhart et al. 2009), im kolorektalen Karzinom (Masuo et al. 2009) sowie im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (Liu et al. 2013) beschrieben. In der vorliegenden Arbeit konnte in FTC 133 wt TSH-R Zellen erstmals die Expression von Calcium/Calcineurin-abhängigen NFAT-Varianten in einer Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie demonstriert werden. Die Quantifizierung der NFAT mRNA offenbarte, dass NFATc3 von den Calcium/Calcineurin-abhängigen NFAT-Varianten am stärksten exprimiert wurde (Abb. 5.4). Doch auch NFATc1 und NFATc2 mRNA wurden exprimiert, wogegen die NFAT-Variante NFATc4 nicht nachgewiesen werden konnte. Die Expression von NFATc1, NFATc2 und NFATc3 wurde in FTC 133 wt TSH-R Zellen auf Proteinebene bestätigt.

Mit Hilfe eines NFAT-abhängigen Reportergenkonstrukts wurde gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor in FTC 133 wt TSH-R Zellen TSH-abhängig aktiviert wird (Abb. 5.9). Bei dieser Methode wurde die Aktivität der NFAT Proteine unabhängig von deren Varianten ermittelt, daher könnten alle exprimierten NFAT-Varianten an der TSH-abhängigen NFAT-Aktivierung beteiligt sein. Ausgeschlossen werden konnte jedoch NFATc4, denn dieses Protein wurde in FTC 133 wt TSH-R Zellen nicht exprimiert. Die Calcium/Calcineurin-unabhängige Variante NFAT5, deren Expression nicht überprüft worden war, konnte jedoch ausgeschlossen werden, denn das TSH-induzierte Reportersignal wurde durch den Calcineurin-Inhibitor CsA blockiert. Da die exprimierten NFAT-Varianten NFATc1, NFATc2 und NFATc3 klassischerweise bei einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ über Calcineurin aktiviert werden, könnten diese Proteine alle an der beobachteten NFAT-Aktivierung nach einer TSH-Stimulation beteiligt sein. Die Bestimmung der subzellulären Lokalisation der einzelnen NFAT-Varianten mittels Immunzytochemie deutete jedoch darauf hin, dass ausschließlich NFATc3 durch TSH aktiviert werden konnte, da sich NFATc1 und NFATc2 bereits unter basalen Bedingungen im Zellkern befanden (Abb. 5.6). Eine nukleäre Lokalisation dieser beiden Proteine ist in unstimulierten Zellen zwar eher ungewöhnlich, jedoch auch in anderen Zellsystemen beschrieben, z. B. für NFATc1 in Kardiomyozyten (Rinne et al. 2010) und für NFATc2 in glatten Muskelzellen (Boss et al. 1998). Im Gegensatz zu NFATc1 und NFATc2 war NFATc3 im Zytoplasma der FTC 133 wt TSH-R Zellen lokalisiert und könnte nach einer Aktivierung durch TSH in den Zellkern translozieren. Da selbst nach einer Stimulation mit der Positivkontrolle Ionomycin kein NFATc3 im Zellkern nachgewiesen werden konnte (Abb. 5.7), wurde die subzelluläre Lokalisation von NFATc3 stattdessen mit einem NFATc3-eGFP Fusionsprotein analysiert (Abb. 5.8). Nur sehr wenige Zellen reagierten nach der TSH-Stimulation mit einer schwachen Zunahme der Fluoreszenz im Zellkern. Doch auch nach einer Stimulation

mit dem Calcium-Ionophor A23187 (hier als Positivkontrolle) konnte nur in wenigen Zellen eine Translokation des Fusionsproteins in den Zellkern beobachtet werden. Ein Grund für die nicht sichtbare Akkumulation von NFATc3 im Zellkern könnte der schnelle Export aus dem Zellkern durch Exportkinasen sein, denn sowohl in Kardiomyozyten als auch in Endothelzellen wird NFATc3 im Gegensatz zu NFATc1 streng durch Exportkinasen reguliert (Shen et al. 2006; Rinne et al. 2009).

Vor Drucklegung der vorliegenden Arbeit erschien eine Publikation zur TSH-induzierten Aktivierung eines NFAT-abhängigen Reportergens in HEK 293 Zellen mit überexprimiertem TSH-R (Lorenz et al. 2013). Diese Arbeit ist eine unabhängige Bestätigung der eigenen Ergebnisse und unterstreicht die Bedeutung von NFAT in TSH-stimulierten thyreoidalen Zellen.

6.3.2 Die Rolle von $G_{q/11}$ -Proteinen bei der TSH-vermittelten NFAT-Aktivierung in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Um den Mechanismus der NFAT-Aktivierung aufzuklären, wurde die Expression des NFAT-induzierten Zielgens RCAN1 analysiert und dessen erhöhte Transkription und Proteinbiosynthese als Maß für die NFAT-Aktivierung gewertet. Diese Vorgehensweise hatte den Vorteil, dass die Zellen nicht vor jedem Experiment mit dem NFAT-abhängigen Reportergenkonstrukt sowie einem konstitutiv exprimierten Reportergen transfiziert werden mussten. Die NFAT-abhängige Induktion des Zielgens RCAN1 in FTC 133 wt TSH-R Zellen war zuvor ausführlich überprüft worden und wird in Kapitel 6.3.4.1 diskutiert.

G_s - und $G_{i/o}$ -Proteine waren nicht an der TSH-vermittelten Aktivierung von NFAT beteiligt, obwohl die meisten bisher bekannten zellulären Effekte des TSH-R über G_s und eine folgende Erhöhung der cAMP-Konzentration ausgelöst werden. Da die Aktivierung von Calcineurin, die durch eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ erfolgt, nötig für die NFAT-Aktivierung war (siehe 5.3.4.4), konnte die TSH-vermittelte NFAT-Aktivierung über $G_{q/11}$ -abhängige Signalwege induziert worden sein. Mit Hilfe von spezifischen siRNAs gegen $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ wurde gezeigt, dass bei gleichzeitiger Herunterregulation von $G\alpha_q$ - und $G\alpha_{11}$ -Proteinen die RCAN1 Expression durch TSH nicht mehr gesteigert werden konnte. Damit wurde der Transkriptionsfaktor NFAT als $G\alpha_{q/11}$ -abhängiger Effektor des TSH-R in humanen Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien identifiziert.

Für die Aktivierung des $G_{q/11}$ -Signalweges sind im Vergleich zu G_s höhere TSH-Konzentrationen nötig (Laurent et al. 1987; Yanagita et al. 1996). In diesem Zusammenhang erscheint besonders kritisch, dass in den durchgeführten Untersuchungen eine TSH-Konzentration von 50 mU/ml verwendet wurde, obwohl die physiologische *in vivo* Konzentration bei gesunden Erwachsenen deutlich niedriger ist (etwa 0,45 – 4,12 mU/l

(Hollowell et al. 2002), die Grenzwerte werden noch diskutiert (Biondi 2013)). Die hohen TSH-Konzentrationen mussten jedoch angewendet werden, da die Sensitivität von Thyreozyten *in vivo* deutlich höher ist als die von Schilddrüsenzellen *in vitro* (Pain 1975). Von Aeschimann et al. wurde dies am Beispiel von Iodid gezeigt: die Dosis, die benötigt wurde, um das Wachstum von FRTL-5 Zellen *in vitro* zu inhibieren musste etwa 175 Mal höher sein als *in vivo*, obwohl dasselbe Zellmodell verwendet wurde (Aeschimann et al. 1994).

Die TSH-induzierte Proliferation von Schilddrüsenzellen wird möglicherweise nicht ausschließlich durch G_s -vermittelte Signalwege reguliert, auch $G_{q/11}$ -abhängige Signalwege könnten darin involviert sein (siehe 6.1). Hier könnte der Transkriptionsfaktor NFAT eine wichtige Rolle spielen. Vor allem NFATc1 wird mit erhöhten Proliferationsraten in Verbindung gebracht, seit ein konstitutiv aktives NFATc1-Konstrukt die Zelltransformation von Fibroblasten hervorrief (Neal et al. 2003). Jedoch können aktivierte NFAT Proteine in verschiedenen Zellsystemen unterschiedliche zelluläre Effekte hervorrufen und in Fibroblasten konnten sogar gegensätzliche Effekte von zwei verschiedenen NFAT-Varianten beobachtet werden (Robbs et al. 2008). Wie bereits von Neal et al. beobachtet, verursachte die Überexpression eines aktiven NFATc1-Konstrukts eine Transformation der Fibroblasten, während das aktive NFATc2-Konstrukt keine Transformation hervorrief (Robbs et al. 2008). Stattdessen konnte die Überexpression des aktiven NFATc2-Konstrukts das Wachstum von transformierten Zellen sogar reduzieren und zeigte damit Eigenschaften eines Tumorsuppressors (Robbs et al. 2008). Die Rolle von NFAT in Karzinomzellen ist nicht nur in Bezug auf die Proliferation, sondern auch darüber hinaus noch nicht verstanden. Sie ist vermutlich vor allem davon abhängig, welche Zielgene durch den Transkriptionsfaktor im jeweiligen Gewebe oder Zellsystem induziert werden.

6.3.3 Die Rolle von Calciumionen bei der TSH-vermittelten NFAT-Aktivierung in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Die Calcium/Calcineurin-abhängigen NFAT-Varianten (NFATc1, NFATc2, NFATc3 und NFATc4) werden nach einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ über Calmodulin/Calcineurin aktiviert. Damit war die TSH-abhängige Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in FTC 133 wt TSH-R Zellen Voraussetzung für die NFAT-Aktivierung. Eine Messung unter Calciumionen-freien Bedingungen offenbarte, dass bei TSH-induzierter Stimulation Calciumionen aus intrazellulären Calciumionenspeichern (z. B. dem ER) beteiligt sein mussten. Da die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in Calciumionen-freier Umgebung niedriger als unter physiologischer Calciumionenkonzentration war, bestand zusätzlich die Option eines TSH-abhängigen Calciumioneneinstroms aus dem Extrazellulärraum.

Mit Hilfe eines Mangan-„Quench“-Experiments wurde der Einstrom von bivalenten Kationen festgestellt, der unter physiologischen Bedingungen einem Calcium-ioneneinstrom aus dem Extrazellulärraum entsprechen sollte. Für den regulierten Einstrom von Calciumionen aus dem Extrazellulärraum sind bisher vier verschiedene Calciumionenkanal-Klassen beschrieben: Spannungsgesteuerte Ionenkanäle (VGCC), durch äußere Reize (z. B. mechanische Reize oder Temperatur) regulierte Kanäle, Liganden-gesteuerte Ionenkanäle sowie Speicher-operierte Ionenkanäle (SOC). Interessanterweise wurde der Einstrom von bivalenten Kationen erst 25 Sekunden nach der TSH-Stimulation beobachtet, während die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ unmittelbar nach der Stimulation auftrat. Diese Zeitverzögerung deutete darauf hin, dass der Calcium-ioneneinstrom aus dem Extrazellulärraum durch die Entleerung der intrazellulären Calciumionenspeicher und eine folgende Öffnung von SOC bedingt sein konnte. Ein Calciumioneneinstrom über SOC (engl.: „store-operated Ca^{2+} entry“, SOCE) war außerdem wahrscheinlich, da dieser in vielen nicht-erregbaren Zellen essenziell für eine Aktivierung von NFAT ist (Müller et al. 2010).

Der TSH-induzierte Calciumioneneinstrom aus dem Extrazellulärraum war essenziell für die TSH-vermittelte Aktivierung von NFAT, denn die mRNA-Expression des NFAT-Zielgens RCAN1 war abhängig von extrazellulären Calciumionen (Abb. 5.33). Demnach war die Aktivierung von NFAT abhängig von einem Calcium-ioneneinstrom aus dem Extrazellulärraum und möglicherweise von einem SOCE.

Bei der Generierung eines SOCE spielen sogenannte CRAC-Kanäle (engl.: „calcium release-activated calcium channel“) eine wichtige Rolle, die in Zellen des Immunsystems entdeckt wurden und seitdem auch in vielen anderen Zellsystemen beschrieben sind (Bergmeier et al. 2013). Diese Kanäle werden aus Multimeren der ORAI Proteinfamilie gebildet, wobei ORAI1 die Pore des CRAC-Kanals bildet (Prakriya et al. 2006; Yeromin et al. 2006; Bergmeier et al. 2013). Geöffnet werden die Kanäle durch die Calciumionen-sensitiven STIM Proteine (engl.: „stromal interaction molecule“), wobei STIM2 im Gegensatz zu STIM1 bereits bei normalen Calciumionenkonzentrationen des ER teilweise aktiv ist und auch bei einer partiellen Entleerung des ER aktiviert wird (Brandman et al. 2007; Thiel et al. 2013). Für eine Aktivierung von NFAT ist dagegen in der Regel die Aktivierung von STIM1 nötig (Oh-Hora et al. 2008; Kar et al. 2012; Mancarella et al. 2013), eine STIM2-abhängige und STIM1-unabhängige NFAT-Aktivierung konnte bisher noch nicht gezeigt werden. Die mit dem STIM1-Inhibitor SKF-96365 durchgeführten Messungen deuteten an, dass die TSH-abhängige NFAT-Aktivierung in FTC 133 wt TSH-R Zellen abhängig von STIM1 ist (Abb. 5.35). Die Inhibition der TSH-vermittelten RCAN1 Expression durch 20 μ M SKF-96365 muss jedoch vorsichtig ausgelegt werden, denn neben STIM1 kann

SKF-96365 auch TRPC-Kanäle, spannungsgesteuerte Calciumionenkanäle sowie Kaliumionenkanäle blockieren. Interessanterweise können in verschiedenen Zellsystemen auch die TRP-Kanäle TRPC1, -C4 und selten auch -C5 durch eine Entleerung von intrazellulären Calciumionenspeichern aktiviert werden (Pani et al. 2012) und so an der Generierung eines SOCE beteiligt sein. Auch dieser SOCE wird über STIM1 initiiert, wobei STIM1-, ORAI1- und TRPC-Proteine ternäre Komplexe formen (Berna-Erro et al. 2012; Pani et al. 2012). Zur Expression von TRPC-Kanälen in Schilddrüsenepithel- und Schilddrüsenkarzinomzellen ist bisher wenig bekannt, einzig in der Ratten-Thyreozyten-Zelllinie FRTL-5 wurde diese Expression bisher untersucht. Hier war der TRPC2-Kanal, welcher beim Menschen nur ein Pseudogen ist (Vannier et al. 1999), der einzig exprimierte TRPC-Kanal (Sukumaran et al. 2012). Ein TRPC-generierter SOCE erscheint in humanen FTC 133 wt TSH-R Zellen daher nicht wahrscheinlich.

Beim Menschen scheint in der Regel ausschließlich ORAI1 eine Rolle bei der Erzeugung eines SOCE zu spielen, es konnte jedoch eine Ausnahme entdeckt werden: bei Estrogen-Rezeptor positiven Brustkrebszellen wird der SOCE stattdessen über ORAI3 ausgelöst (Motiani et al. 2010). Die Herunterregulation von ORAI3 in diesen Zellen führte zu einer signifikant verminderten NFAT-Aktivität nach Stimulation mit Thapsigargin im Vergleich zu Kontroll-siRNA behandelten Zellen (Motiani et al. 2013). Eine NFAT-Aktivierung in malignen Zellen kann somit auch anders verlaufen als über die klassische Öffnung von ORAI1 über STIM1, die überwiegend in Immunzellen beschrieben ist. Eine ORAI1 unabhängige NFAT-Aktivierung nach der TSH-Stimulation von FTC 133 wt TSH-R Zellen ist daher vorstellbar.

6.3.4 TSH-induzierte Expression NFAT-abhängiger Zielgene in FTC 133 wt TSH-R Zellen

Die Funktionalität des aktivierten NFAT Proteins konnte durch die Identifikation der NFAT-regulierten Zielgene RCAN1 und Cox-2, deren Expression nach einer TSH-Stimulation der FTC 133 wt TSH-R Zellen gesteigert wurde, belegt werden.

6.3.4.1 TSH-induzierte RCAN1 Expression

Aufgrund alternativer Startexons existieren verschiedene Isoformen des RCAN1 Proteins (siehe 3.5.5.2). Nur die Expression der Isoform RCAN1.4 kann nach einer Aktivierung von NFAT induziert werden, da diese unter der Kontrolle eines Promoters mit 15 Bindungsmotiven für den Transkriptionsfaktor steht (Yang et al. 2000a). Bei der Analyse der Expression von RCAN1 konnte dieses als TSH-induziertes Gen identifiziert werden und die genauere Charakterisierung zeigte, dass die gesteigerte Expression von RCAN1 durch eine gesteigerte Expression der Isoform RCAN1.4

verursacht worden war (Abb. 5.15, Abb. 5.16 und Abb. 5.17). Mit den Calcineurin-Inhibitoren CsA und FK 506 sowie dem spezifischen NFAT-Inhibitor INCA-6 konnte bestätigt werden, dass die TSH-vermittelte Expression von RCAN1.4 abhängig von Calcineurin/NFAT war und RCAN1.4 ein NFAT-reguliertes Zielgen in Schilddrüsenkarzinomzellen darstellte (siehe 5.3.4.4). Das Calcium-Ionophor Ionomycin und Thapsigargin konnten die Expression von RCAN1 ebenfalls deutlich steigern (Abb. 5.31), daher schien eine anhaltende Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ ausreichend für eine RCAN1 Induktion in FTC 133 wt TSH-R Zellen. Durch diesen Versuch konnte nicht ausgeschlossen werden, dass neben NFAT auch andere Transkriptionsfaktoren an der TSH-abhängigen RCAN1.4 Expression beteiligt waren. Da der *RCAN1.4*-Promoter neben NFAT auch 5 Bindungsmotive für den Transkriptionsfaktor Aktivator Protein 1 (AP-1) enthält (Zhao et al. 2008), wurde die Expression von c-Fos, das Bestandteil von AP-1 sein kann, durch die Inhibition von MEK mit U0126 blockiert (Abb. 5.37). Der Inhibitor hatte keinen signifikanten Einfluss auf die RCAN1 Expression, dies war ein Hinweis darauf, dass AP-1 nicht an der TSH-abhängigen RCAN1 Induktion in FTC 133 wt TSH-R Zellen beteiligt war. Allerdings kann AP-1 auch aus c-Jun Homodimeren gebildet werden, daher wurde in einem zweiten Versuchsansatz die gesamte Gentranslation mit dem Zellgift Cycloheximid blockiert (Abb. 5.38). Diese Behandlung hatte keinen Einfluss auf die TSH-induzierte mRNA-Expression von RCAN1, die Expression von c-Jun und somit auch der Transkriptionsfaktor AP-1 konnten nicht maßgeblich an der TSH-induzierten RCAN1 Expression beteiligt sein. Dass AP-1 nicht an der Regulation von RCAN1.4 beteiligt ist, wurde bereits von Oh et al. vermutet, da bei der Analyse des *RCAN1.4*-Promoters keine typische NFAT/AP-1 Bindungsstelle identifiziert werden konnte (Oh et al. 2010). Stattdessen zeigte die Arbeitsgruppe, dass das CCAAT/Enhancer-Binding-Protein β (C/EBP β) NFAT binden und die Expression von RCAN1.4 erhöhen kann (Oh et al. 2010). C/EBP β wird auch in Thyreozyten und Schilddrüsenkarzinomzellen exprimiert (Pomérance et al. 2005; Akagi et al. 2008) und seine transkriptionelle Aktivität kann durch die Phosphorylierung z. B. durch ERK 1/2 induziert werden (Hungness et al. 2002). Obwohl es Hinweise darauf gibt, dass der Transkriptionsfaktor unter anderem durch TSH reguliert wird (Pomérance et al. 2005), wurde eine Beteiligung von C/EBP β bei der TSH-induzierten RCAN1.4 Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen praktisch ausgeschlossen. Zum einen ist der Transkriptionsfaktor in Schilddrüsenkarzinomzellen überwiegend im Zytoplasma und nicht im Zellkern lokalisiert (Pomérance et al. 2005; Akagi et al. 2008), zum anderen ist die Aktivierung des *RCAN1.4*-Promoters durch C/EBP β Calcineurin unabhängig und die Transfektion von C/EBP β alleine war in der Myoblasten Zelllinie C2C12 bereits ausreichend, um ein RCAN1.4 Reportergenkonstrukt zu induzieren (Oh et al. 2010). In

FTC 133 wt TSH-R Zellen wurde nach der Inhibition von Calcineurin TSH-abhängig jedoch kein RCAN1.4 mehr induziert. Neben AP-1 und C/EBP β kann auch GATA-2/3 zusammen mit NFAT die Expression von RCAN1 induzieren, dies wurde nach einer VEGF- und Thrombin-Stimulation von Endothelzellen gezeigt (Minami et al. 2004). NFAT könnte in FTC 133 wt TSH-R Zellen daher zusammen mit GATA-2/3 die RCAN1.4 Expression induzieren. Allerdings ist die Expression von GATA-2/3 in Thyreozyten oder Schilddrüsenkarzinomen nicht beschrieben und, da der Gentranslationsinhibitor Cycloheximid keinen Einfluss auf die TSH-abhängige RCAN1 Expression hatte, erscheint eine Beteiligung von GATA-2/3 sehr unwahrscheinlich. Möglicherweise war die Aktivierung von NFAT alleine ausreichend für eine TSH-induzierte RCAN1.4 Expression oder NFAT interagiert mit einem Transkriptionsfaktor, der bereits in basalen FTC 133 wt TSH-R Zellen aktiv war.

RCAN1 Proteine binden an die Phosphatase Calcineurin und inhibieren diese dadurch (Fuentes et al. 2000; Kingsbury et al. 2000; Rothermel et al. 2000), daher könnte das durch TSH induzierte RCAN1.4 in FTC 133 wt TSH-R Zellen einen negativen Rückkopplungsmechanismus der Calcineurin-Aktivierung darstellen. Über einen negativen Rückkopplungsmechanismus hinaus könnte die TSH-abhängige RCAN1.4 Expression die basale Calcineurin Aktivität auch langanhaltend inhibieren. Ähnlich ist dies in Schilddrüsenkarzinomzellen für den Stimulus Metastin beschrieben, der die Calcineurin Aktivität zuerst akut erhöht, bevor er sie signifikant reduziert (Stathatos et al. 2005). Die Inhibition der Calcineurin Aktivität wurde mit einer Metastin-induzierten RCAN1.4 Expression in Verbindung gebracht (Stathatos et al. 2005). Effekte von RCAN1.4 auf das Zellverhalten könnten daher entweder über die Inhibition von Calcineurin zustande kommen oder aber auch über einen Calcineurin-unabhängigen Mechanismus stattfinden.

Ein Analyse der Zellproliferation offenbarte, dass die Stimulation der FTC 133 wt TSH-R Zellen mit TSH die Proliferation inhibierte (Abb. 5.42). Durch TSH wird neben RCAN1.4 jedoch auch die Expression von vielen anderen Proteinen induziert, welche die Zellproliferation beeinflussen können, daher wurde in einem zweiten Ansatz außerdem die Expression von RCAN1 herunterreguliert. Diese hatte einen inhibierenden Effekt auf die basale Proliferation der Zellen. Da in diesem Zustand RCAN1.4 nur sehr gering exprimiert wurde, war der Effekt mit großer Wahrscheinlichkeit dem Protein RCAN1.1 zuzuordnen. RCAN1.1 würde demnach die Proliferation von FTC 133 wt TSH-R Zellen fördern. Der Effekt der TSH-induzierten RCAN1.4 Expression war dagegen schwieriger einzuordnen. Bei einer Stimulation mit TSH unterschied sich die Zellproliferation von Zellen, in denen RCAN1.4 herunterreguliert war, nicht signifikant von den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. Der

Unterschied in der Zellproliferation zwischen unstimulierten und mit TSH stimulierten FTC 133 wt TSH-R Zellen, die mit siRNA gegen RCAN1 transfiziert worden waren, war jedoch kleiner als bei den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. Demnach könnte sich die Expression von RCAN1.4 negativ auf die Zellproliferation der FTC 133 wt TSH-R Zellen auswirken und einen tumorsuppressiven Effekt haben. Um die Effekte der RCAN1 Herunterregulation auf die Zellproliferation von FTC 133 wt TSH-R Zellen besser einordnen zu können, wurde außerdem eine Analyse der Koloniebildungsfähigkeit durchgeführt (Abb. 5.43). Dabei wurden unstimulierte und TSH-stimulierte Zellen verglichen, die mit siRNA gegen RCAN1 oder mit Kontroll-siRNA transfiziert worden waren. Die Koloniezahlen unterschieden sich jedoch nicht signifikant voneinander, was als Hinweis zu verstehen war, dass die Expression von RCAN1 siRNA keinen Effekt auf die Koloniebildung von FTC 133 wt TSH-R Zellen hat und somit nicht zytotoxisch für die Zellen war. Allerdings waren die Kolonien der mit RCAN1 siRNA transfizierten, unstimulierten Zellen deutlich kleiner als diejenigen der mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. Dies könnte, ähnlich wie die Bestimmung der Zellproliferation mittels XTT, darauf hindeuten, dass die basale Expression des Proteins RCAN1.1 die Proliferation der FTC 133 wt TSH-R Zellen begünstigte. Im Fall einer TSH-Stimulation hatten die RCAN1 siRNA transfizierten Zellen deutlich größere Kolonien ausgebildet. Da RCAN1 in diesem Fall nicht induziert werden konnte, war dieser Effekt abhängig von TSH, jedoch unabhängig von RCAN1. Dass Kontroll-siRNA-transfizierte FTC 133 wt TSH-R Zellen nach einer Stimulation mit TSH nicht größere Kolonien als unstimulierte Zellen ausbildeten, könnte daran liegen, dass hier bereits die maximale Proliferation erreicht war. Möglich ist jedoch auch, dass die stattfindende RCAN1.4 Expression die sonst gesteigerte Proliferation inhibierte und damit einen proliferationshemmenden Effekt hatte.

Viele Autoren favorisieren eine Rolle von RCAN1 als Tumorsuppressor. Denn in Individuen, welche die Genom-Mutation Trisomie 21 aufweisen, ist die Inzidenz der meisten soliden Tumoren reduziert (Hasle et al. 2000; Yang et al. 2002; Patja et al. 2006), was mit der Überexpression der Proteine, die auf Chromosom 21 lokalisiert sind, darunter auch RCAN1, in Verbindung gebracht wird (Baek et al. 2009). In einem Mausmodell für Trisomie 21 konnte gezeigt werden, dass das Tumorwachstum aufgrund eines Defizits in der Tumorangiogenese vermindert ist (Baek et al. 2009; Reynolds et al. 2010). Von Baek et al. wurde dabei postuliert, dass die Angiogenese zumindest teilweise durch die erhöhte Expression von RCAN1 inhibiert wurde, da das Tumorwachstum bei nur zwei RCAN1-Allelen im ansonsten gleichen Mausmodell signifikant erhöht war (Baek et al. 2009). Diese Schlussfolgerung wurde von Reynolds

et al. in Frage gestellt, denn in dem von dieser Arbeitsgruppe verwendeten Trisomie 21 Mausmodell wurde RCAN1 nicht überexprimiert, trotzdem aber ein Defizit in der Tumorangiogenese beobachtet (Reynolds et al. 2010). Dass RCAN1 eine Rolle in der Angiogenese spielen könnte, wurde auch in anderen Arbeiten beschrieben. Kürzlich konnte in einem Mausmodell, das spontan Lungen-Adenokarzinom entwickelt, gezeigt werden, dass durch eine zusätzliche Kopie des *RCAN1*-Gens die Dichte von Mikrogefäßen bei gleicher Tumorgroße reduziert war (Shin et al. 2013). Dies war verbunden mit einer verlängerten Lebenszeit der Tiere (Shin et al. 2013). In Kollagen Gel Assays mit Zellen aus dem Endothel der Nabelschnurvenen von Neugeborenen (engl.: „Human Umbilical Vein Endothelial Cells“, HUVEC) konnte durch VEGF die Bildung kapillarähnlicher Strukturen hervorgerufen werden, was durch die Überexpression von RCAN1 inhibiert wurde (Minami et al. 2004). In derselben Publikation wurde gezeigt, dass RCAN1 außerdem einen direkten Einfluss auf die Proliferation von primären humanen Endothelzellen hat. Die Überexpression von RCAN1 induzierte einen Zellzyklusarrest in der G₀/G₁-Phase (Minami et al. 2004). Auch von anderen Autoren wurden bereits diverse Einflüsse einer veränderten RCAN1 Expression auf die Proliferation von Zellen beschrieben, z. B. reduzierte die Überexpression des Hamster-Homologs Adapt78 in HA-1 Zellen (chinesische Hamster Fibroblasten) das Zellwachstum signifikant (Leahy et al. 1999). Mit diesen Studien konnte die in den FTC 133 wt TSH-R Zellen beobachtete RCAN1 Expression durch TSH jedoch nicht gleichgesetzt werden, da in diesen Zellen ausschließlich die Isoform RCAN1.4 einen proliferationshemmenden Effekt hatte. Die konstitutive Expression von RCAN1.1 könnte sich in Schilddrüsenkarzinomzellen stattdessen wachstumsfördernd auswirken, denn die Herunterregulation von RCAN1 führte zu einer reduzierten Proliferation der Zellen. Ein gegensätzlicher Effekt von RCAN1.1 und RCAN1.4 ist durchaus vorstellbar und wurde auch von Qin et al. beschrieben (Qin et al. 2006). Die Überexpression von RCAN1.1 führte zu einer gesteigerten Proliferation von HUVEC Zellen, während die Überexpression von RCAN1.4 in diesen Zellen zwar keinen signifikanten Effekt auf das Zellwachstum hatte, die Herunterregulation von RCAN1.4 die Proliferation aber steigerte (Qin et al. 2006). Aufgrund weiterer Daten wurde von dieser Arbeitsgruppe vermutet, dass RCAN1.4 als negativer Rückkopplungsmechanismus der Calcineurin/NFAT-Aktivierung diene, RCAN1.1 dagegen Calcineurin nicht wie erwartet inhibierte, sondern stattdessen aktivierte (Qin et al. 2006). Im Gegensatz dazu wurde von Lee et al. ein Calcineurin-unabhängiger Effekt von RCAN1.4 auf die Proliferation der humanen Glioblastom-Zelllinie U87MG gezeigt (Lee et al. 2009). In diesem Fall führte die Herunterregulation von RCAN1.4 zu einer Inhibition der Zellproliferation, was durch die Inhibition der MAPK-Signalkaskade verursacht wurde

(Lee et al. 2009). Von den Autoren wurde vorgeschlagen, dass eine Herunterregulation von RCAN1.4 die Zellproliferation über einen Calcineurin-abhängigen Mechanismus erhöhen und über einen Calcineurin-unabhängigen Mechanismus reduzieren kann (Lee et al. 2009). Diese Interpretation könnte außerdem mit einer Studie von Stathatos et al. übereinstimmen, in der durch die Stimulation des überexprimierten G_q-Protein-gekoppelten Rezeptors 54 (GPR54) in der papillären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie NPA die Zellzahl im Vergleich zu NPA Zellen, die den Rezeptor nicht exprimierten, signifikant verringert wurde (Stathatos et al. 2005). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass der Ligand des GPR54, Metastin, die Expression von RCAN1.4 induzierte und nach einer akuten Erhöhung der Calcineurin Aktivität diese nachfolgend chronisch inhibiert wurde (Stathatos et al. 2005). Demnach wäre ein Proliferations-inhibierender Effekt der TSH-abhängigen RCAN1.4 Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen über die Inhibition des Calcineurin/NFAT-Signalweges zu verstehen.

Neben Effekten auf die Proliferation von Zellen kann RCAN1 auch einen Einfluss auf Zellmigration und -invasion haben. In der Studie von Stathatos et al. wurde in der Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie NPA neben einer Proliferationsinhibition durch Metastin auch eine Migrationsinhibition beobachtet (Stathatos et al. 2005). Da die Inhibition von Calcineurin einen ähnlichen Effekt hatte, wurde die verminderte Migration ebenfalls mit der Expression von RCAN1.4 in Verbindung gebracht. Diese These wurde gestützt durch histologische Befunde, wobei einige primäre Schilddrüsentumoren RCAN1 exprimierten, in Metastasen jedoch kein RCAN1 nachgewiesen werden konnte (Stathatos et al. 2005). Allerdings wurde in dieser Publikation nicht gezeigt, dass der Migrations-inhibierende Metastin Effekt direkt von RCAN1.4 ausging und bei der histologischen Untersuchung der Schilddrüsentumoren wurde nicht zwischen den verschiedenen RCAN1-Isoformen unterschieden. In anderen Veröffentlichungen wurde der Ursprung der vermeintlichen Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie NPA in Frage gestellt und diese als genetischer Zwilling der Melanom-Zelllinie M14 identifiziert (Schweppe et al. 2008; Espinosa et al. 2009). Eine Rolle von RCAN1 auf das Migrationsverhalten von Schilddrüsenkarzinomzellen wurde jedoch in einer späteren Studie bestätigt. Für FTC 133 Zellen, die den TSH-R nicht stabil exprimieren, konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von RCAN1 die Migration der Zellen *in vitro* herabsetzt (Espinosa et al. 2009). Außerdem führte die Herunterregulation der basalen RCAN1 Expression in Subklonen der Kolonkarzinom-Zelllinie HT29 zu einer erhöhten Zellmotilität (Espinosa et al. 2009). Laut dieser Studie könnte RCAN1 also als Suppressor der Zellmotilität dienen. Demgegenüber steht eine Studie von Iizuka et al., in der die Herunterregulation von RCAN1 die VEGF-vermittelte Migration von HUVEC Zellen inhibierte und die VEGF-induzierte RCAN1.4 Expression somit als positiver Regulator der Zellmigration

beschrieben wurde (Iizuka et al. 2004). Aufgrund der widersprüchlichen Datenlage wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt der TSH-induzierten RCAN1.4 Expression auf die Zellmigration analysiert und die RCAN1 Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen mit Hilfe einer spezifischen siRNA herunterreguliert. Hierbei zeigte sich bei unstimulierten Zellen eine erhöhte Migration im Vergleich zu untransfizierten Zellen. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant, würde jedoch die Daten von Espinosa et al. bestätigen. Da in unstimulierten FTC 133 wt TSH-R Zellen die Expression von RCAN1.4 jedoch sehr gering war, sollte dieser Effekt durch RCAN1.1 hervorgerufen worden sein. Die TSH-Stimulation hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Migrationsverhalten der Kontroll-siRNA transfizierten FTC 133 wt TSH-R Zellen. Im Gegensatz dazu wurde die Migration von FTC 133 wt TSH-R Zellen, in denen RCAN1 herunterreguliert war, signifikant verringert. Dieses Ergebnis deutete einen Migrationsfördernden Effekt der TSH-induzierten RCAN1.4 Expression an. Dazu schien jedoch im Gegensatz zu stehen, dass TSH die Migration von Zellen, die nicht mit siRNA gegen RCAN1 transfiziert worden waren, nicht signifikant beeinflussen konnte. Diese Beobachtung könnte jedoch damit erklärt werden, dass TSH neben RCAN1.4 auch die Expression vieler anderer Gene induzierte und diese Faktoren den Effekt der RCAN1.4 Expression maskierten. Erst die unterdrückte RCAN1.4 Expression könnte daher den Migrationsfördernden Effekt von RCAN1.4 offenbart haben.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Funktion von RCAN1 legten also nahe, dass die Isoformen RCAN1.1 und RCAN1.4 des Proteins RCAN1 unterschiedliche und möglicherweise sogar gegensätzliche Effekte auf das Zellverhalten haben.

6.3.4.2 TSH-induzierte Cox-2 Expression

Als weiteres NFAT-abhängiges Zielgen wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression der Cyclooxygenase 2 (Cox-2) analysiert, diese wurde bei einer TSH-Stimulation der FTC 133 wt TSH-R Zellen Konzentrations-abhängig signifikant gesteigert. Da nach einer Vorinkubation der Zellen mit jeweils einem der beiden Calcineurin-Inhibitoren CsA und FK 506 oder mit dem spezifischen NFAT-Inhibitor INCA-6 die TSH-induzierte Cox-2 Expression blockiert werden konnte, wurde somit Cox-2 als NFAT-abhängiges Zielgen in FTC 133 wt TSH-R Zellen identifiziert. Außerdem war die Expression abhängig von $G_{\alpha_{11}}$ -Proteinen und schien daher über denselben Signalweg aktiviert zu werden wie auch RCAN1.4. Allerdings ist möglich, dass neben einer Aktivierung von NFAT bei der TSH-induzierten Cox-2 Expression auch andere, zusätzliche Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielen, die für die TSH-induzierte Expression von RCAN1.4 nicht benötigt werden. Denn bei Kontroll-siRNA transfizierten

FTC 133 wt TSH-R Zellen konnte Ionomycin die Cox-2 Expression im Vergleich zu TSH nur schwach steigern (Abb. 5.62), während unter gleichen Bedingungen die RCAN1.4 Expression durch Ionomycin mindestens genauso stark wie durch TSH induziert wurde (Abb. 5.30). Hierfür spricht außerdem, dass Ionomycin in der angewendeten Konzentration den Transkriptionsfaktor NFAT mindestens genauso stark wie TSH aktivieren konnte (Abb. 5.9). Möglicherweise wurde die Ionomycin-induzierte Expression von Cox-2 also durch die Transfektion mit Kontroll-siRNA blockiert oder die alleinige Aktivierung von NFAT ist in FTC 133 wt TSH-R Zellen nicht ausreichend für eine starke Induktion von Cox-2. Auch in T-Zellen ist die Aktivierung von NFAT zwar nötig für Aktivierung des *Cox-2*-Promoters, eine Ionomycin-Stimulation kann die Cox-2 Expression jedoch nicht signifikant erhöhen (Iñiguez et al. 2000). Für die maximale Induktion des *Cox-2*-Promoters mussten T-Zellen stattdessen sowohl mit Ionomycin als auch dem PKC-Aktivator PMA stimuliert werden (Iñiguez et al. 2000). Ein Zusammenspiel von NFAT mit einem PKC-abhängigen Signalweg war auch bei der TSH-abhängigen Cox-2 Expression in FTC 133 wt TSH-R Zellen denkbar, da beide Effektoren durch den $G_{q/11}$ -Signalweg aktiviert werden und nach der Herunterregulation von $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ die Cox-2 Expression durch TSH nicht mehr signifikant gesteigert werden konnte. Für die Aktivierung des *Cox-2*-Promoters in T-Zellen war neben NFAT auch der Transkriptionsfaktor AP-1 nötig, der möglicherweise durch die Aktivierung der PKC und eine folgende Expression von c-Jun gebildet wurde (Iñiguez et al. 2000). Auch in FTC 133 wt TSH-R Zellen kann TSH-abhängig AP-1 gebildet werden, da nach einer TSH-Stimulation sowohl die Expression von c-Fos als auch von c-Jun induziert wird (Abb. 5.36). Die Beteiligung von AP-1 bei der TSH-induzierten Cox-2 Expression erscheint jedoch eher unwahrscheinlich, da nach Inhibition der Gentranslation mittels Cycloheximid, unter der kein AP-1 gebildet werden kann, die TSH-induzierte mRNA-Expression von Cox-2 nicht vermindert, sondern sogar erhöht war (Abb. 5.63). Zwar war dieser Unterschied nicht signifikant, er könnte jedoch durch die inhibierte Proteinbiosynthese von RCAN1.4 verursacht worden sein, wodurch der negative Rückkopplungsmechanismus für die Calcineurin-Aktivierung ausgesetzt wurde. Sollte neben NFAT noch ein anderer Transkriptionsfaktor an der TSH-induzierten Expression von Cox-2 in FTC 133 wt TSH-R Zellen beteiligt gewesen sein, müsste dieser – ähnlich wie NFAT – bereits im unstimulierten Zustand der Zellen exprimiert und durch die Stimulation mit TSH aktiviert worden sein.

Die Ergebnisse zur Analyse des Signalweges der TSH-induzierten NFAT-Aktivierung und folgenden RCAN1.4 sowie Cox-2 Expression sind als Zusammenfassung in Abb. 6.1 graphisch dargestellt.

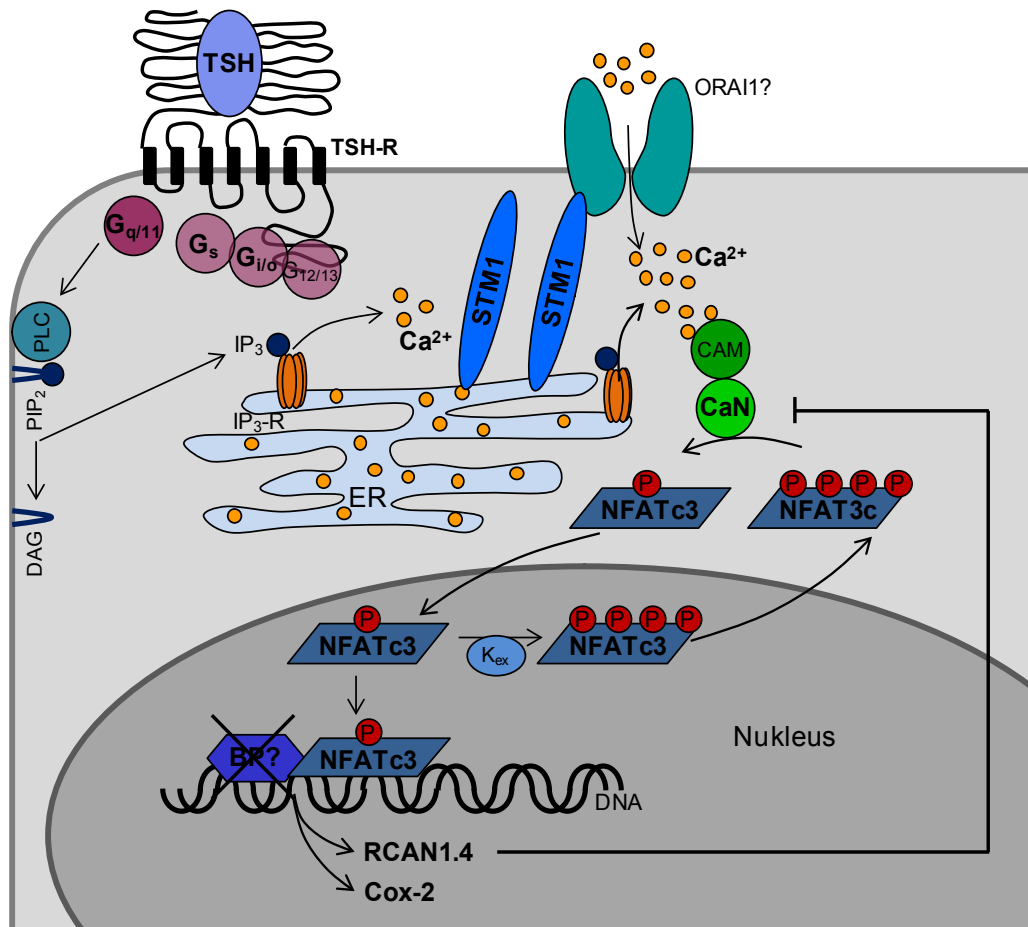


Abb. 6.1: Übersicht zu beteiligten Signalmolekülen bei der TSH-induzierten NFAT-Aktivierung und folgenden Expression von RCAN1.4 und Cox-2

Bindet Thyreotropin (TSH) an den TSH-Rezeptor (TSH-R), werden die G-Proteine aller vier Familien ($G_{q/11}$, G_s , $G_{i/o}$, $G_{12/13}$) aktiviert. $G_{q/11}$ -abhängig werden über die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und die folgende Generierung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) Calciumionen (Ca^{2+}) aus dem ER freigesetzt und folglich die intrazelluläre Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) initial erhöht. Durch die abnehmende Calciumkonzentration im ER wird das Calcium-sensitive Protein STIM1 aktiviert und öffnet Speicher-operierte Calciumkanäle, möglicherweise ORAI1. Es kommt es zu einem anhaltenden Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum, wodurch die $[Ca^{2+}]_i$ weiterhin erhöht bleibt. Die Calciumionen binden an Calmodulin (CAM), das in diesem Zustand die Phosphatase Calcineurin (CaN) bindet und aktiviert. Calcineurin katalysiert die Dephosphorylierung multiple phosphorylierter NFAT Proteine, vermutlich NFATc3, das auf diese Weise aktiviert und in den Zellkern transloziert wird. Hier initiiert es die Transkription seiner Zielgene RCAN1.4 und Cox-2, für die wahrscheinlich keine Interaktion mit anderen Bindungspartnern (BP) nötig ist. Nach der Phosphorylierung durch Exportkinasen (K_{ex}) wird NFATc3 aus dem Zellkern zurück ins Zytosol transportiert, wo es erneut durch Calcineurin aktiviert werden kann. Die Expression des endogenen Calcineurin-Inhibitors RCAN1.4 dient vermutlich als negativer Rückkopplungsmechanismus für die NFAT-Aktivierung. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Signalmoleküle und Strukturen des Signalwegs sind fett beschriftet. DAG: Diacylglycerol; PIP_2 : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat.

Die TSH-induzierte Cox-2 Expression könnte eine funktionelle Rolle bei der Entwicklung von Schilddrüsenkarzinomen spielen, denn durch erhöhte Synthese von Prostaglandinen kann Angiogenese gefördert (Fosslien 2001), Apoptose inhibiert (Tsuji et al. 1995; Sheng et al. 1998), sowie Zellinvasion und -proliferation (Sheng et al. 2001)

erhöht werden. Eine erhöhte Expression von Cox-2 wird daher mit Tumorigenese in Verbindung gebracht. In vielen Tumoren, darunter Lunge (Hida et al. 1998), Brust (Hwang et al. 1998) und Kolon (Eberhart et al. 1994), wird Cox-2 überexprimiert und in klinischen Studien konnte in einigen Tumorarten ein Zusammenhang zwischen der Cox-2 Expression und einer schlechteren klinischen Prognose aufgestellt werden (Rizzo 2011). Auch im Schilddrüsenkarzinom ist die Expression von Cox-2 bereits mehrfach beschrieben (Krawczyk-Rusiecka et al. 2010). Die erste Studie, bei der eine Überexpression von Cox-2 im Schilddrüsenkarzinom nachgewiesen wurde, wurde im Jahr 2002 von Specht et al. durchgeführt. Im Vergleich zu benachbartem, gesunden Gewebe waren die mRNA-Level statistisch signifikant erhöht und in 8 von 10 Tumorproben wurde Cox-2 Protein überexprimiert, während benigne Veränderungen sich nicht signifikant vom benachbarten Gewebe unterschieden (Specht et al. 2002). Auch von Cornetta et al. wurde eine Überexpression von Cox-2 ausschließlich in Schilddrüsenkarzinomen, nicht aber in gesundem Schilddrüsengewebe oder multinodulärem Kropfgewebe festgestellt (Cornetta et al. 2002). Interessanterweise konnte Cox-2 hier jedoch ausschließlich in differenzierten Tumoren (papilläre und follikuläre Schilddrüsenkarzinome) nachgewiesen werden, im anaplastischen Schilddrüsenkarzinom jedoch nicht (Cornetta et al. 2002). In einer anderen Studie konnte in 81,3 % aller papillären Schilddrüsenkarzinome die Expression des Proteins Cox-2 nachgewiesen werden, wobei diese Expression signifikant reduziert war in Fällen, wo Patienten ein höheres Alter erreicht hatten (älter als 54 Jahre), der Tumor größer war und sich in einem fortgeschrittenen Stadium befand (Ito et al. 2003). Ähnlich postulierten auch García-González et al., dass Cox-2 in papillären Schilddrüsenkarzinomen eher in frühen Krebsstadien eine Rolle spielt, da Cox-2 in papillären Mikrokarzinomen signifikant häufiger als in allen papillären Karzinomen überexprimiert wurde (García-González et al. 2005). Auch Kim et al. beobachteten einen (jedoch nicht signifikanten) inversen Zusammenhang zwischen der Cox-2 Expression und der Größe der Schilddrüsentumoren. In dieser Studie wurde Cox-2 vor allem in den Tumoren exprimiert, die noch keine Metastasen in Lymphknoten gebildet hatten (Kim et al. 2012). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Befunden bei anderen Krebsarten, z. B. in Adenokarzinomen der Lunge oder hepatozellulären Karzinomen wird Cox-2 in gut differenzierten Tumorproben mehr exprimiert als in undifferenzierten Stadien (Wolff et al. 1998; Koga et al. 1999). Möglicherweise spielt Cox-2 also vor allem eine Rolle in frühen Tumorstadien, einschließlich der Tumorigenese, und hat in fortgeschrittenen Stadien keine Bedeutung. Die Expression von Cox-2 könnte mit der Expression des TSH-R korrelieren, der auch nur in frühen Tumorstadien exprimiert wird. Allerdings existieren hierzu auch gegenteilige Befunde. In einer Studie von Siironen et al. nahm

die Cox-2 Expression in papillären Schilddrüsentumoren mit dem Alter der Patienten zu und wurde deswegen mit einem aggressiveren Phänotyp in Verbindung gebracht (Siironen et al. 2004). In einer anderen Studie war die Cox-2 Expression in undifferenzierten Schilddrüsentumoren deutlich stärker ausgeprägt als in follikulären und papillären Schilddrüsentumoren und korrelierte mit dem Tumorstadium sowie lymphatischen Metastasen (Ji et al. 2012). Die Cox-2 Expression in Schilddrüsenkarzinomen könnte mit einer erhöhten Rückfallrate sowie einem früheren Tod in Verbindung stehen, da Haynik et al. bei Patienten mit Cox-2 Expression häufiger Rückfälle, Metastasen oder Todesfälle feststellten (Haynik et al. 2005). Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Haynik et al. 2005).

Die Funktion von Cox-2 im Schilddrüsenkarzinom wurde auch in vitro analysiert. So konnte der spezifische Cox-2-Inhibitor NS-398 in einer Studie von Kajita et al. das Zellwachstum der papillären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie THP-1 reduzieren (Kajita et al. 2005). Scarpino et al. konnten diese Daten nicht bestätigen. Vielmehr inhibierte NS-398 die Zellmigration und –invasion der THP-1 Zellen und durch den Hepatozyten Wachstumsfaktor (HGF), der die Expression von Cox-2 induzierte, konnte die Migration der Zellen gesteigert werden (Scarpino et al. 2009). In dieser Studie wurde außerdem beobachtet, dass Cox-2 nicht homolog in Tumorgewebe exprimiert wird, sondern signifikant höher an der Invasionsfront des Tumors vorhanden ist (Scarpino et al. 2009). Damit könnte sowohl überexprimiertes als auch durch TSH induziertes Cox-2 die Metastasierung von Schilddrüsenkarzinomen fördern. Interessanterweise konnte in zwei unabhängigen Studien zu Schilddrüsenkarzinomen eine Korrelation in der Expression von Cox-2 und VEGF gezeigt werden (Siironen et al. 2006; Ji et al. 2012). In vitro Analysen deuteten zudem darauf hin, dass die beiden Gene durch dieselben Faktoren kontrolliert werden könnten (Siironen et al. 2006). Da VEGF möglicherweise ebenso wie Cox-2 ein TSH-induziertes und NFAT-abhängiges Zielgen in Schilddrüsenkarzinomzellen darstellt (siehe 5.3.2), könnte die Coexpression der beiden Proteine auf den aktivierten Transkriptionsfaktor NFAT zurückzuführen sein. Eine klinische Relevanz von Cox-2 im Schilddrüsenkarzinom ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt. Da in einigen Studien eine Cox-2 Expression nicht ausschließlich in Schilddrüsenkarzinomen, sondern auch in Adenomen vorgefunden wurde, wird von diesen Autoren postuliert, dass die Expression von Cox-2 in Schilddrüsenkarzinomen keine Bedeutung hat (Fuhrer et al. 2005; Lee et al. 2008). Im Jahr 2006 wurde mit dem selektiven Cox-2-Inhibitor Celecoxib eine klinische Studie der Phase II in Patienten mit progressivem metastatischem differenziertem Schilddrüsenkarzinom durchgeführt, bei denen eine vorherige Standardtherapie fehlgeschlagen war. Aufgrund fehlender Wirksamkeit sowie neuer Daten, nach denen Cox-2-Inhibitoren das kardiovaskuläre System

der Patienten negativ beeinflussen, wurde die Studie frühzeitig beendet (Mrozek et al. 2006). Nur einer der insgesamt 32 Teilnehmer der Studie schloss die Therapie progressionsfrei ab und bei einem Teilnehmer wurde zumindest eine Teilantwort registriert (Mrozek et al. 2006). In diesen Patienten, die beide an papillärem Schilddrüsenkarzinom erkrankt waren, konnte jedoch eine starke Cox-2 Expression diagnostiziert werden, während zwei von drei anderen getesteten Teilnehmern im Wesentlichen keine Cox-2 Expression aufwiesen (Mrozek et al. 2006). Von Sheu et al. wurde im Rahmen einer Cox-2 Expressionsstudie daher postuliert, dass die Inhibition von Cox-2 eine therapeutische Option für solche sonst nicht zu therapierenden Patienten sein könnte, die Cox-2 nachweislich in starkem Ausmaß exprimieren (Sheu et al. 2009).

6.4 TSH-induzierte Metallothionein 1 Expression

In vorausgegangenen Arbeiten von Nowak et al. und Bäck et al. wurde die Metallothionein(MT)-Variante MT1X als TSH-induziertes Zielgen identifiziert, das abhängig von dem $G_{q/11}$ -Signalweg reguliert wird (Nowak 2005; Bäck 2009). Zu diesem Befund hatte ein Vergleich von TSH-stimulierten FTC 133 wt TSH-R Zellen mit solchen Zellen geführt, die eine mutierte Form des TSH-R stabil exprimierten. In diesen FTC 133 Y601H Zellen war an der Position des 601 ein Tyrosin (Y) gegen ein Histidin (H) ausgetauscht, wodurch eine Kopplung des TSH-R an G_q - und G_{11} -Proteine verhindert wurde (Biebermann et al. 1998). Die Herunterregulation der G_{α_q} - und $G_{\alpha_{11}}$ -Proteine mittels siRNA konnte unabhängig von den FTC 133 Y601H Zellen bestätigen, dass die TSH-vermittelte Expression von MT1X in FTC 133 wt TSH-R Zellen durch den $G_{q/11}$ -Signalweg reguliert wurde (Abb. 5.65). Allerdings wurde nach der Herunterregulation der beiden G-Proteine die TSH-abhängige Expression von MT1X im Gegensatz zu der von RCAN1.4 und Cox-2 nicht signifikant vermindert und die $G_{\alpha_{q/11}}$ -Abhängigkeit dementsprechend nicht ganz eindeutig präsentiert. Neben $G_{\alpha_{q/11}}$ -Proteinen könnten zusätzlich auch andere G-Proteine in die TSH-induzierte MT1X Expression involviert sein. Da in anderen Zellsystemen bereits eine cAMP-abhängige Regulation von MT beschrieben ist (Cousins et al. 1986), ist möglich, dass auch die Aktivierung von G_{α_s} eine Rolle spielte. Diese These wurde dadurch bekräftigt, dass der Adenylylcyclasen-Aktivator Forskolin (FSK) ebenfalls die Expression von MT1X induzierte. Jedoch konnte eine Beteiligung von cAMP und PKA bei der TSH-induzierten MT1X Expression nicht nachgewiesen werden, denn das cAMP-Analogon Rp-cAMPS, das die cAMP-vermittelte Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) kompetitiv inhibiert, hatte hier keinen Einfluss, während FSK bei Vorinkubation mit dem Inhibitor MT1X nicht mehr induzieren konnte (Abb. 5.70). Der durch TSH

aktivierte G_s -Signalweg schien daher nicht maßgeblich an der MT1X Expression beteiligt zu sein. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen cAMP-Effekte von TSH und FSK ist die zelluläre Kompartimentierung des TSH-R zusammen mit spezifischen Adenylylcyclase-Subtypen (Calebiro et al. 2009). FSK als unspezifischer Aktivator von membranständigen Adenylylcyclasen unterscheidet nicht zwischen einzelnen Zellkompartimenten, wodurch andere zelluläre Reaktionen hervorgerufen werden können.

Eine Beteiligung von $G_{q/11}$ -Proteinen bei der TSH-induzierten MT1X Expression wurde durch die Abhängigkeit von Calciumionen und Proteinkinase C (PKC), zwei klassischen Effektoren dieses Signalweges, weiterführend analysiert. Die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ alleine war nicht ausreichend, um eine MT1X Expression zu induzieren, wie die Stimulation von FTC 133 wt TSH-R Zellen mit den Calciumionen-mobilisierenden Stimuli ATP oder Carbachol (CCh) zeigte (Abb. 5.67 und Abb. 5.68). Die Inkubation mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin, das einen massiven Einstrom von Calciumionen in die Zelle bewirkt, konnte die MT1X mRNA-Expression nur gering und nicht signifikant erhöhen (Abb. 5.66). Dieser Expressionsanstieg durch Ionomycin könnte dadurch zustande kommen sein, dass im Vergleich zu einer Stimulation spezifischer Rezeptoren sehr ausgeprägte und unphysiologische $[Ca^{2+}]_i$ in einer Zelle entstehen können. Dennoch konnte mit Hilfe des Zell-permeablen und selektiven Calciumionen-Chelators BAPTA/AM gezeigt werden, dass Calciumionen nötig für die TSH-vermittelte MT1X Expression sind (Bäck et al. 2013). Die alleinige Aktivierung der PKC mittels PMA war dagegen ausreichend, um die Expression von MT1X mRNA zu erhöhen und durch Untersuchungen mit dem PKC-Inhibitor Bisindolylmaleinimid (BIM) konnte bestätigt werden, dass dieser $G_{q/11}$ -Signalweg Effektor sowohl in FTC 133 wt TSH-R Zellen als auch in primären Thyreozyten an der TSH-induzierten Expression von MT1X beteiligt war (Bäck et al. 2013). Die Ergebnisse zur Analyse des Signalweges der TSH-induzierten MT1X Expression sind als Zusammenfassung in Abb. 6.2 graphisch dargestellt.

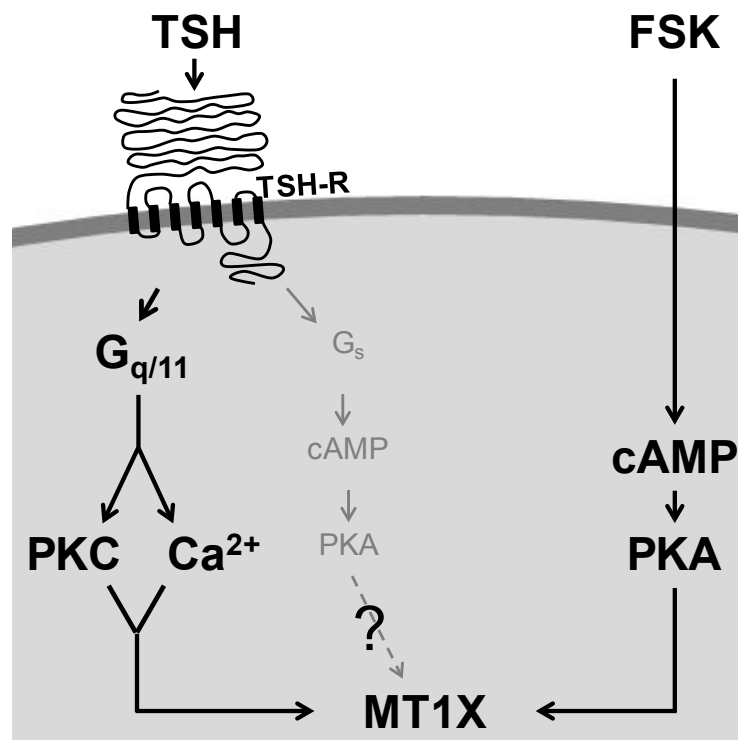


Abb. 6.2: Übersicht zu beteiligten Signalmolekülen bei der TSH- und Forskolin-induzierten Expression von MT1X

Sowohl TSH als auch der direkte Adenylylcyclasen-Aktivator Forskolin (FSK) können in FTC 133 wt TSH-R Zellen die Expression von MT1X induzieren. Doch obwohl beide Stimuli die intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen und folglich die Proteinkinase A (PKA) aktivieren, ist die PKA vermutlich nicht an der TSH-induzierten MT1X Expression beteiligt. Stattdessen ist diese abhängig von G_{q/11}-vermittelten Signalwegen. Um eine MT1X Expression zu induzieren, sind Calciumionen (Ca²⁺) nötig, jedoch nicht ausreichend. Eine wichtige Rolle spielt außerdem die Proteinkinase C (PKC), deren alleinige Aktivierung ausreichend ist, um die Expression von MT1X zu erhöhen.

In Studien zur Cadmiumionen-induzierten Metallothionein Expression in Schilddrüsenkarzinomzellen konnte eine Calciumionen-abhängige Expression von MT gezeigt werden (Liu et al. 2007). Zusätzlich zu Calciumionen ist eine Aktivierung von ERK 1/2 nötig, um Cadmiumionen-abhängig MT1 und MT2 zu induzieren (Liu et al. 2007; Liu et al. 2009). Im Gegensatz dazu konnte TSH trotz einer Inhibition der ERK 1/2-Aktivierung MT1X induzieren (Abb. 5.71). Die TSH-vermittelte Expression von MT1X unterschied sich also trotz einer Abhängigkeit von Calciumionen vom Signalweg der Cadmiumionen-induzierten Expression von MT1X.

Bivalente Kationen wie z. B. Cadmiumionen oder Zinkionen induzieren Metallothioneine klassischerweise, indem sie mit dem Transkriptionsfaktor MTF1 (engl.: „metal-responsive transcription factor“) interagieren (Heuchel et al. 1994). Nach dieser Bindung transloziert MTF1 rasch in den Zellkern (Smirnova et al. 2000), wo es an bestimmte Regionen seiner Ziel-DNA binden und so die Transkription initiieren kann (Brugnera et al. 1994). Jedoch haben Cadmiumionen keinen wesentlichen Effekt

auf die Bindungsaffinität von MTF1 (Hurley 1999) und geringe, nicht toxische Cadmiumionen-Konzentrationen haben nur einen marginalen Effekt auf die MTF1 Translokation, obwohl sie Metallothioneine stark induzieren können (Smirnova et al. 2000). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass MTF1 durch eine komplexe und nicht im Detail verstandene Signaltransduktionskaskade, an der auch die PKC beteiligt ist, phosphoryliert und so transaktiviert werden kann (LaRochelle et al. 2001). Vermutlich wird über diesen Mechanismus auch die TSH-vermittelte MT1X Expression induziert, da diese bei Inhibition der PKC vermindert war und der PKC-aktivierende Phorbol-Ester PMA ebenfalls eine MT1X Expression induzieren konnte.

Zur physiologischen Bedeutung von MT in der Schilddrüse ist bisher erst wenig bekannt, ihre Expression ist (neben der in vielen anderen Geweben und Zellsystemen) sowohl in gesunden als auch in neoplastischen Schilddrüsenepithelzellen beschrieben (Nartey et al. 1987) und in Schilddrüsen von Patienten mit Morbus Basedow werden MT sogar überexprimiert (Ruiz-Riol et al. 2012). Zum einen scheint in Thyreozyten der protektive Effekt von Metallothioneinen gegenüber toxischen zweiwertigen Schwermetallen (Park et al. 2001) relevant zu sein, denn in MT1- und MT2-defizienten Mäuse führte die perinatale Exposition von Cadmiumchlorid im Gegensatz zu Wildtypmäusen zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Schilddrüsenfunktion (Mori et al. 2006). In den MT-defizienten Tieren waren die Serum T₄-Konzentrationen signifikant verringert, während die der Wildtypmäuse bei gleicher Behandlung nur leicht verändert waren (Mori et al. 2006). Neben der Inaktivierung von zweiwertigen Schwermetallen können Metallothioneine auch reaktive Sauerstoffradikale, z. B. H₂O₂ und andere Peroxide, binden und so vor oxidativem Stress schützen (Li et al. 2004; Baird et al. 2006). In der Schilddrüse könnte diese Funktion im Vordergrund stehen, da in Thyreozyten hohe Peroxid-Konzentrationen benötigt werden, damit die Iodid-Oxidation erfolgen und Thyreoglobulin iodiniert werden kann (Schweizer et al. 2008). Interessanterweise werden sowohl die Peroxid-Bildung (Kimura et al. 1995; Grasberger 2010) als auch die Expression von MT1X TSH-abhängig über G_{α_{q/11}} reguliert. Da für die Aktivierung des G_{q/11}-Signalweges höhere Konzentrationen als für die Aktivierung von G_s benötigt werden, wird so nur im Fall der Generierung von H₂O₂ gleichzeitig Metallothionein exprimiert. Zudem konnte in Kulturen von primären Schilddrüsenepithelzellen gezeigt werden, dass die Expression von Metallothioneinen gemeinsam reguliert wird mit der der Thyreoperoxidase (TPO), einem Schlüsselenzym bei der Thyreoglobulin Iodinierung (Eszlinger et al. 2006). Da Metallothioneine vor oxidativem Stress schützen können, erscheinen diese gemeinsamen Regulationen mechanistisch sinnvoll und bekräftigen die Theorie, dass Metallothioneine im gesunden Schilddrüsengewebe physiologisch relevant sind.

Neben dieser Schutzfunktion spielen Metallothioneine auch in pathologischen Prozessen eine Rolle. In vielen Krebsarten werden teilweise gegenteilige Effekte beobachtet (Cherian et al. 2003; Pedersen et al. 2009): in diversen Krebsarten, darunter Brust-, Lungen- und Prostatakarzinome, werden MT1 und MT2 überexprimiert, was oftmals mit einer Resistenz gegen Chemotherapie und einer schlechteren Prognose verbunden ist. In anderen Krebsarten wie z. B. dem hepatozellulären Karzinom können die beiden Proteine herunterreguliert sein, was mit einer geringeren Lebenserwartung verknüpft ist (Pedersen et al. 2009). Auch eine Expression von Metallothioneinen in differenzierten Schilddrüsenkarzinomen ist bereits seit längerer Zeit beschrieben (Nartey et al. 1987). Verglichen mit gesundem Schilddrüsengewebe sind viele Varianten von MT1 jedoch im papillären Schilddrüsenkarzinom herunterreguliert, darunter MT1E, MT1G, MT1H und MT1X (Huang et al. 2003; Ferrario et al. 2008). Für MT1G konnte eine Hypermethylierung in der 5'-Genregion aufgezeigt werden, die Herunterregulation erfolgt daher möglicherweise hauptsächlich über epigenetische Mechanismen. Da die Transfektion eines MT1G-Konstruktes zu verringerten Wachstumsraten einer papillären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie führte, könnten Metallothioneine hier als Tumorsuppressor fungieren (Ferrario et al. 2008). Die verminderte Expression von Metallothioneinen könnte sogar an der Entstehung des papillären Schilddrüsenkarzinoms beteiligt sein, da die Thyreozyten bei der Peroxid-Generierung in diesem Fall möglicherweise keine Schutzfunktion aufweisen und freie Radikale ihre DNA schädigen könnten. In diesem Zusammenhang scheint plausibel, dass anhaltender oxidativer Stress als wichtiger Faktor für die Pathogenese von Schilddrüsenkarzinomen gilt (Wang et al. 2011; Xing 2012). Zur Physiologie bzw. Pathophysiologie der Metallothioneine im follikulären Schilddrüsenkarzinom existieren bisher keine Daten, jedoch scheinen diese sich von denen des papillären Schilddrüsenkarzinoms zu unterscheiden. Denn im follikulären Schilddrüsenkarzinom sind Metallothioneine nur selten herunterreguliert (Ferrario et al. 2008), stattdessen findet im Vergleich zu gesundem Schilddrüsengewebe sogar eine Überexpression statt (Królicka et al. 2010). Interessanterweise ist vor allem die Variante MT1X in papillärem und follikulärem Schilddrüsenkarzinom besonders gegensätzlich reguliert (Ferrario et al. 2008). Die TSH-induzierte Expression von MT1X könnte daher spezifisch für follikuläre Schilddrüsenkarzinome und gesunde Thyreozyten sein. Die biologische Konsequenz dieser unterschiedlichen MT1X Regulation ist zum aktuellen Zeitpunkt jedoch nicht verstanden.

7 Literaturverzeichnis

- Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, Steward DL, Fidler JP, Giordano TJ, Biddinger PW, et al. Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *The American journal of surgical pathology*. 2006; 30 (2): 216-222.
- Aeschimann S, Gerber H, von Grünigen C, Oestreicher M, Studer H. The degree of inhibition of thyroid follicular cell proliferation by iodide is a highly individual characteristic of each cell and differs profoundly in vitro and in vivo. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 1994; 130 (6): 595-600.
- Akagi T, Luong QT, Gui D, Said J, Selektar J, Yung A, Bunce CM, et al. Induction of sodium iodide symporter gene and molecular characterisation of HNF3 beta/FoxA2, TTF-1 and C/EBP beta in thyroid carcinoma cells. *British journal of cancer*. 2008; 99 (5): 781-788.
- Allen MD, Neumann S, Gershengorn MC. Occupancy of both sites on the thyrotropin (TSH) receptor dimer is necessary for phosphoinositide signaling. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2011; 25 (10): 3687-3694.
- Allgeier A, Laugwitz KL, Van Sande J, Schultz G, Dumont JE. Multiple G-protein coupling of the dog thyrotropin receptor. *Molecular and cellular endocrinology*. 1997; 127 (1): 81-90.
- Allgeier A, Offermanns S, Van Sande J, Spicher K, Schultz G, Dumont JE. The human thyrotropin receptor activates G-proteins Gs and Gq/11. *The Journal of biological chemistry*. 1994; 269 (19): 13733-13735.
- Apel RL, Ezzat S, Bapat BV, Pan N, LiVolsi VA, Asa SL. Clonality of thyroid nodules in sporadic goiter. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B*. 1995; 4 (2): 113-121.
- Aramburu J, Garcia-Cózar F, Raghavan A, Okamura H, Rao A, Hogan PG. Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT. *Molecular cell*. 1998; 1 (5): 627-637.
- Arikawa K, Ichikawa Y, Yoshida T, Shinozawa T, Homma M, Momotani N, Ito K. Blocking type antithyrotropin receptor antibody in patients with nongoitrous hypothyroidism: its incidence and characteristics of action. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1985; 60 (5): 953-959.
- Avni O, Lee D, Macian F, Szabo SJ, Glimcher LH, Rao A. T(H) cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nature immunology*. 2002; 3 (7): 643-651.
- Bäck CM. Signalwege des TSH-Rezeptors, G_{q/11}-vermittelte Regulation von Metallothioneinen in Schilddrüsenkarzinomzellen [Dissertation]: Philipps-Universität Marburg; 2009.
- Bäck CM, Stohr S, Schäfer EA, Biebermann H, Boekhoff I, Breit A, Gudermann T, et al. TSH induces metallothionein 1 in thyrocytes via Gq/11- and PKC-dependent signaling. *Journal of molecular endocrinology*. 2013; 51 (1): 79-90.
- Baek KH, Zaslavsky A, Lynch RC, Britt C, Okada Y, Siarey RJ, Lensch MW, et al. Down's syndrome suppression of tumour growth and the role of the calcineurin inhibitor DSCR1. *Nature*. 2009; 459 (7250): 1126-1130.

- Baird SK, Kurz T, Brunk UT. Metallothionein protects against oxidative stress-induced lysosomal destabilization. *The Biochemical journal*. 2006; 394 (Pt 1): 275-283.
- Baltoumas FA, Theodoropoulou MC, Hamodrakas SJ. Interactions of the alpha-subunits of heterotrimeric G-proteins with GPCRs, effectors and RGS proteins: A critical review and analysis of interacting surfaces, conformational shifts, structural diversity and electrostatic potentials. *Journal of structural biology*. 2013.
- Basolo F, Pisaturo F, Pollina LE, Fontanini G, Elisei R, Molinaro E, Iacconi P, et al. N-ras mutation in poorly differentiated thyroid carcinomas: correlation with bone metastases and inverse correlation to thyroglobulin expression. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2000; 10 (1): 19-23.
- Belfiore A, La Rosa GL, La Porta GA, Giuffrida D, Milazzo G, Lupo L, Regalbuto C, et al. Cancer risk in patients with cold thyroid nodules: relevance of iodine intake, sex, age, and multinodularity. *The American journal of medicine*. 1992; 93 (4): 363-369.
- Bergmeier W, Weidinger C, Zee I, Feske S. Emerging roles of store-operated Ca (2+) entry through STIM and ORAI proteins in immunity, hemostasis and cancer. *Channels*. 2013; 7 (4).
- Berna-Erro A, Redondo PC, Rosado JA. Store-operated Ca(2+) entry. *Advances in experimental medicine and biology*. 2012; 740: 349-382.
- Biebermann H, Schöneberg T, Schulz A, Krause G, Grüters A, Schultz G, Gudermann T. A conserved tyrosine residue (Y601) in transmembrane domain 5 of the human thyrotropin receptor serves as a molecular switch to determine G-protein coupling. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1998; 12 (14): 1461-1471.
- Bink K, Walch A, Feuchtinger A, Eisenmann H, Hutzler P, Höfler H, Werner M. TO-PRO-3 is an optimal fluorescent dye for nuclear counterstaining in dual-colour FISH on paraffin sections. *Histochemistry and cell biology*. 2001; 115 (4): 293-299.
- Biondi B. The normal TSH reference range: what has changed in the last decade? *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013; 98 (9): 3584-3587.
- Bodor J, Bodorova J, Gress RE. Suppression of T cell function: a potential role for transcriptional repressor ICER. *Journal of leukocyte biology*. 2000; 67 (6): 774-779.
- Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*. 2007; 129 (5): 865-877.
- Boss V, Abbott KL, Wang XF, Pavlath GK, Murphy TJ. The cyclosporin A-sensitive nuclear factor of activated T cells (NFAT) proteins are expressed in vascular smooth muscle cells. Differential localization of NFAT isoforms and induction of NFAT-mediated transcription by phospholipase C-coupled cell surface receptors. *The Journal of biological chemistry*. 1998; 273 (31): 19664-19671.
- Bouvier M, Hausdorff WP, De Blasi A, O'Dowd BF, Kobilka BK, Caron MG, Lefkowitz RJ. Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature*. 1988; 333 (6171): 370-373.
- Bower KE, Zeller RW, Wachsman W, Martinez T, McGuire KL. Correlation of transcriptional repression by p21(SNFT) with changes in DNA.NF-AT complex interactions. *The Journal of biological chemistry*. 2002; 277 (38): 34967-34977.

- Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1962; 115: 453-466.
- Bradley J, Reiser J, Frings S. Regulation of cyclic nucleotide-gated channels. *Current opinion in neurobiology*. 2005; 15 (3): 343-349.
- Brandman O, Liou J, Park WS, Meyer T. STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca^{2+} levels. *Cell*. 2007; 131 (7): 1327-1339.
- Brown JM, Attardi LD. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nature reviews Cancer*. 2005; 5 (3): 231-237.
- Brugnera E, Georgiev O, Radtke F, Heuchel R, Baker E, Sutherland GR, Schaffner W. Cloning, chromosomal mapping and characterization of the human metal-regulatory transcription factor MTF-1. *Nucleic acids research*. 1994; 22 (15): 3167-3173.
- Büch TR, Biebermann H, Kalwa H, Pinkenburg O, Hager D, Barth H, Aktories K, et al. G13-dependent activation of MAPK by thyrotropin. *The Journal of biological chemistry*. 2008; 283 (29): 20330-20341.
- Buchholz M, Ellenrieder V. An emerging role for Ca^{2+} /calcineurin/NFAT signaling in cancerogenesis. *Cell cycle*. 2007; 6 (1): 16-19.
- Buchholz M, Schatz A, Wagner M, Michl P, Linhart T, Adler G, Gress TM, et al. Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca^{2+} /calcineurin signaling pathway. *The EMBO journal*. 2006; 25 (15): 3714-3724.
- Bünemann M, Hosey MM. G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling. *The Journal of physiology*. 1999; 517 (Pt 1): 5-23.
- Busnardo B, De Vido D. The epidemiology and etiology of differentiated thyroid carcinoma. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2000; 54 (6): 322-326.
- Byrd JK, Yawn RJ, Wilhoit CS, Sora ND, Meyers L, Fernandes J, Day T. Well differentiated thyroid carcinoma: current treatment. *Current treatment options in oncology*. 2012; 13 (1): 47-57.
- Calebiro D, Gelmini G, Cordella D, Bonomi M, Winkler F, Biebermann H, de Marco A, et al. Frequent TSH receptor genetic alterations with variable signaling impairment in a large series of children with nonautoimmune isolated hyperthyrotropinemia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012; 97 (1): E156-160.
- Calebiro D, Nikolaev VO, Gagliani MC, de Filippis T, Dees C, Tacchetti C, Persani L, et al. Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors. *PLoS biology*. 2009; 7 (8): e1000172.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 1994; 263 (5148): 802-805.
- Chang CP, Neilson JR, Bayle JH, Gestwicki JE, Kuo A, Stankunas K, Graef IA, et al. A field of myocardial-endocardial NFAT signaling underlies heart valve morphogenesis. *Cell*. 2004; 118 (5): 649-663.
- Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 2001; 410 (6824): 37-40.

- Chen-Goodspeed M, Lukan AN, Dessauer CW. Modeling of Galpha(s) and Galpha(i) regulation of human type V and VI adenylyl cyclase. *The Journal of biological chemistry*. 2005; 280 (3): 1808-1816.
- Chen M, O'Connor KL. Integrin alpha6beta4 promotes expression of autotaxin/ENPP2 autocrine motility factor in breast carcinoma cells. *Oncogene*. 2005; 24 (32): 5125-5130.
- Chen ST, Shieh HY, Lin JD, Chang KS, Lin KH. Overexpression of thyroid hormone receptor beta1 is associated with thyrotropin receptor gene expression and proliferation in a human thyroid carcinoma cell line. *The Journal of endocrinology*. 2000; 165 (2): 379-389.
- Cherian MG, Jayasurya A, Bay BH. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutation research*. 2003; 533 (1-2): 201-209.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*. 1987; 162 (1): 156-159.
- Claus M, Neumann S, Kleinau G, Krause G, Paschke R. Structural determinants for G-protein activation and specificity in the third intracellular loop of the thyroid-stimulating hormone receptor. *J Mol Med (Berl)*. 2006; 84 (11): 943-954.
- Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, Mazzaferri EL, et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2009; 19 (11): 1167-1214.
- Corcoran CA, He Q, Huang Y, Sheikh MS. Cyclooxygenase-2 interacts with p53 and interferes with p53-dependent transcription and apoptosis. *Oncogene*. 2005; 24 (9): 1634-1640.
- Cornetta AJ, Russell JP, Cunnane M, Keane WM, Rothstein JL. Cyclooxygenase-2 expression in human thyroid carcinoma and Hashimoto's thyroiditis. *The Laryngoscope*. 2002; 112 (2): 238-242.
- Corrèze C, Blondeau JP, Pomerance M. The thyrotropin receptor is not involved in the activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinases by thyrotropin preparations in Chinese hamster ovary cells expressing the human thyrotropin receptor. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2000; 10 (9): 747-752.
- Corvilain B, van Sande J, Laurent E, Dumont JE. The H₂O₂-generating system modulates protein iodination and the activity of the pentose phosphate pathway in dog thyroid. *Endocrinology*. 1991; 128 (2): 779-785.
- Cousins RJ, Dunn MA, Leinart AS, Yedinak KC, DiSilvestro RA. Coordinate regulation of zinc metabolism and metallothionein gene expression in rats. *The American journal of physiology*. 1986; 251 (6 Pt 1): E688-694.
- Crabtree GR, Olson EN. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell*. 2002; 109 Suppl: S67-79.
- Crowthers KC, Kline V, Giardina C, Lynes MA. Augmented humoral immune function in metallothionein-null mice. *Toxicology and applied pharmacology*. 2000; 166 (3): 161-172.
- D'Arcangelo D, Silletta MG, Di Francesco AL, Bonfitto N, Di Cerbo A, Falasca M, Corda D. Physiological concentrations of thyrotropin increase cytosolic calcium levels in primary cultures of human thyroid cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1995; 80 (4): 1136-1143.

- Da Costa CR, Johnstone AP. Production of the thyrotrophin receptor extracellular domain as a glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane protein and its interaction with thyrotrophin and autoantibodies. *The Journal of biological chemistry*. 1998; 273 (19): 11874-11880.
- Daaka Y, Pitcher JA, Richardson M, Stoffel RH, Robishaw JD, Lefkowitz RJ. Receptor and G betagamma isoform-specific interactions with G protein-coupled receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997; 94 (6): 2180-2185.
- Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC, Li F. The c-Myc target gene network. *Seminars in cancer biology*. 2006; 16 (4): 253-264.
- de Wet JR, Wood KV, Helinski DR, DeLuca M. Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985; 82 (23): 7870-7873.
- Decker EL, Nehmann N, Kampen E, Eibel H, Zipfel PF, Skerka C. Early growth response proteins (EGR) and nuclear factors of activated T cells (NFAT) form heterodimers and regulate proinflammatory cytokine gene expression. *Nucleic acids research*. 2003; 31 (3): 911-921.
- DeLellis RA, Lloyd RL, Heitz PU: *World Health Organisation Classification of Tumours, Pathology and Genetics - Tumours of Endocrine Organs*, 2004. IARC Press, Lyon.
- Demeure MJ, Doffek KM, Wilson SD. Defective thyrotropin receptor G-protein cyclic adenosine monophosphate signaling mechanism in the FTC human follicular thyroid cancer cell line. *Surgery*. 1997; 122 (6): 1195-1201; discussion 1201-1192.
- Dere WH, Hirayu H, Rapoport B. TSH and cAMP enhance expression of the myc proto-oncogene in cultured thyroid cells. *Endocrinology*. 1985; 117 (5): 2249-2251.
- Dessauer CW, Chen-Goodspeed M, Chen J. Mechanism of G α i-mediated inhibition of type V adenylyl cyclase. *The Journal of biological chemistry*. 2002; 277 (32): 28823-28829.
- Dessauer CW, Tesmer JJ, Sprang SR, Gilman AG. Identification of a G α binding site on type V adenylyl cyclase. *The Journal of biological chemistry*. 1998; 273 (40): 25831-25839.
- Dong W, Li Y, Li X, Hu M, Aodengqimuge, Sun L, Guo N, et al. p85 α mediates NFAT3-dependent VEGF induction in the cellular UVB response. *Journal of cell science*. 2013; 126 (Pt 6): 1317-1322.
- Doss RC, Perkins JP, Harden TK. Recovery of beta-adrenergic receptors following long term exposure of astrocytoma cells to catecholamine. Role of protein synthesis. *The Journal of biological chemistry*. 1981; 256 (23): 12281-12286.
- Downes GB, Gautam N. The G protein subunit gene families. *Genomics*. 1999; 62 (3): 544-552.
- Dumont JE. The action of thyrotropin on thyroid metabolism. *Vitamins and hormones*. 1971; 29: 287-412.
- Dumont JE, Jauniaux JC, Roger PP. The cyclic AMP-mediated stimulation of cell proliferation. *Trends in biochemical sciences*. 1989; 14 (2): 67-71.

- Dumont JE, Lamy F, Roger P, Maenhaut C. Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors. *Physiological reviews*. 1992; 72 (3): 667-697.
- Dumuis A, Bouhelal R, Sebben M, Cory R, Bockaert J. A nonclassical 5-hydroxytryptamine receptor positively coupled with adenylate cyclase in the central nervous system. *Molecular pharmacology*. 1988; 34 (6): 880-887.
- Duncliffe KN, Bert AG, Vadas MA, Cockerill PN. A T cell-specific enhancer in the interleukin-3 locus is activated cooperatively by Oct and NFAT elements within a DNase I-hypersensitive site. *Immunity*. 1997; 6 (2): 175-185.
- Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology*. 1994; 107 (4): 1183-1188.
- Eibl JK, Abdallah Z, Ross GM. Zinc-metallothionein: a potential mediator of antioxidant defence mechanisms in response to dopamine-induced stress. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2010; 88 (3): 305-312.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001; 411 (6836): 494-498.
- Erdem H, Gündogdu C, Şipal S. Correlation of E-cadherin, VEGF, COX-2 expression to prognostic parameters in papillary thyroid carcinoma. *Experimental and molecular pathology*. 2011; 90 (3): 312-317.
- Espinosa AV, Shinohara M, Porchia LM, Chung YJ, McCarty S, Saji M, Ringel MD. Regulator of calcineurin 1 modulates cancer cell migration in vitro. *Clinical & experimental metastasis*. 2009; 26 (6): 517-526.
- Estour B, Van Herle AJ, Juillard GJ, Totanes TL, Sparkes RS, Giuliano AE, Klandorf H. Characterization of a human follicular thyroid carcinoma cell line (UCLA RO 82 W-1). *Virchows Archiv B, Cell pathology including molecular pathology*. 1989; 57 (3): 167-174.
- Eszlinger M, Jaeschke H, Paschke R. Insights from molecular pathways: potential pharmacologic targets of benign thyroid nodules. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. 2007; 14 (5): 393-397.
- Eszlinger M, Krohn K, Beck M, Kipling D, Forbes-Robertson S, Läter J, Toenjes A, et al. Comparison of differential gene expression of hot and cold thyroid nodules with primary epithelial cell culture models by investigation of co-regulated gene sets. *Biochimica et biophysica acta*. 2006; 1763 (3): 263-271.
- Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 2002; 420 (6916): 629-635.
- Feng F, Wang H, Hou S, Fu H. Re-induction of cell differentiation and (131)I uptake in dedifferentiated FTC-133 cell line by TSHR gene transfection. *Nuclear medicine and biology*. 2012; 39 (8): 1261-1265.
- Ferguson SS, Barak LS, Zhang J, Caron MG. G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1996; 74 (10): 1095-1110.
- Ferrario C, Lavagni P, Gariboldi M, Miranda C, Losa M, Cleris L, Formelli F, et al. Metallothionein 1G acts as an oncosuppressor in papillary thyroid carcinoma. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 2008; 88 (5): 474-481.

- Fiddes JC, Goodman HM. The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones. *Journal of molecular and applied genetics*. 1981; 1 (1): 3-18.
- Flockhart RJ, Armstrong JL, Reynolds NJ, Lovat PE. NFAT signalling is a novel target of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *British journal of cancer*. 2009; 101 (8): 1448-1455.
- Fosslien E. Review: molecular pathology of cyclooxygenase-2 in cancer-induced angiogenesis. *Annals of clinical and laboratory science*. 2001; 31 (4): 325-348.
- Franco AT, Malaguarnera R, Refetoff S, Liao XH, Lundsmith E, Kimura S, Pritchard C, et al. Thyrotrophin receptor signaling dependence of Braf-induced thyroid tumor initiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011; 108 (4): 1615-1620.
- Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*. 2006; 1 (5): 2315-2319.
- Franklyn JA, Wood DF, Balfour NJ, Ramsden DB, Docherty K, Chin WW, Sheppard MC. Effect of hypothyroidism and thyroid hormone replacement in vivo on pituitary cytoplasmic concentrations of thyrotropin-beta and alpha-subunit messenger ribonucleic acids. *Endocrinology*. 1987; 120 (6): 2279-2288.
- Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular pharmacology*. 2003; 63 (6): 1256-1272.
- French CA, Alexander EK, Cibas ES, Nose V, Laguette J, Faquin W, Garber J, et al. Genetic and biological subgroups of low-stage follicular thyroid cancer. *The American journal of pathology*. 2003; 162 (4): 1053-1060.
- Fuentes JJ, Genescà L, Kingsbury TJ, Cunningham KW, Pérez-Riba M, Estivill X, de la Luna S. DSCR1, overexpressed in Down syndrome, is an inhibitor of calcineurin-mediated signaling pathways. *Human molecular genetics*. 2000; 9 (11): 1681-1690.
- Fuentes JJ, Pritchard MA, Estivill X. Genomic organization, alternative splicing, and expression patterns of the DSCR1 (Down syndrome candidate region 1) gene. *Genomics*. 1997; 44 (3): 358-361.
- Fuentes JJ, Pritchard MA, Planas AM, Bosch A, Ferrer I, Estivill X. A new human gene from the Down syndrome critical region encodes a proline-rich protein highly expressed in fetal brain and heart. *Human molecular genetics*. 1995; 4 (10): 1935-1944.
- Fuhrer D, Eszlinger M, Karger S, Krause K, Engelhardt C, Hasenclever D, Dralle H, et al. Evaluation of insulin-like growth factor II, cyclooxygenase-2, ets-1 and thyroid-specific thyroglobulin mRNA expression in benign and malignant thyroid tumours. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2005; 152 (5): 785-790.
- Fujita T, Matsui M, Takaku K, Uetake H, Ichikawa W, Taketo MM, Sugihara K. Size- and invasion-dependent increase in cyclooxygenase 2 levels in human colorectal carcinomas. *Cancer research*. 1998; 58 (21): 4823-4826.
- Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*. 2001; 294 (5548): 1871-1875.
- Gallo A, Benusiglio E, Bonapace IM, Feliciello A, Cassano S, Garbi C, Musti AM, et al. v-ras and protein kinase C dedifferentiate thyroid cells by down-regulating

- nuclear cAMP-dependent protein kinase A. *Genes & development*. 1992; 6 (9): 1621-1630.
- García-González M, Abdulkader I, Boquete AV, Neo XM, Forteza J, Cameselle-Teijeiro J. Cyclooxygenase-2 in normal, hyperplastic and neoplastic follicular cells of the human thyroid gland. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2005; 447 (1): 12-17.
- Gaudineau B, Fougère M, Guaddachi F, Lemoine F, de la Grange P, Jauliac S. Lipocalin 2, the TNF-like receptor TWEAKR and its ligand TWEAK act downstream of NFAT1 to regulate breast cancer cell invasion. *Journal of cell science*. 2012; 125 (Pt 19): 4475-4486.
- Geldof AA, Versteegh LRT, van Mourik JC, Rooimans MA, Arwert F, Hermesen MA, Schadee-Eestermans IL, et al. Clonally related but phenotypically divergent human cancer cell lines derived from a single follicular thyroid cancer recurrence (TT2609). *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2001; 11 (10): 909-917.
- Genescà L, Aubareda A, Fuentes JJ, Estivill X, De La Luna S, Pérez-Riba M. Phosphorylation of calcipressin 1 increases its ability to inhibit calcineurin and decreases calcipressin half-life. *The Biochemical journal*. 2003; 374 (Pt 2): 567-575.
- Gérard C, Verrier B, Mauchamp J, Penel C. Thyrotropin regulation of basolateral Cl⁻ and I⁻ effluxes in thyroid follicles in culture. *Molecular and cellular endocrinology*. 1994; 106 (1-2): 195-205.
- Gérard CM, Lefort A, Libert F, Christophe D, Dumont JE, Vassart G. Transcriptional regulation of the thyroperoxydase gene by thyrotropin and forskolin. *Molecular and cellular endocrinology*. 1988; 60 (2-3): 239-242.
- Gether U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocrine reviews*. 2000; 21 (1): 90-113.
- Giffin MJ, Stroud JC, Bates DL, von Koenig KD, Hardin J, Chen L. Structure of NFAT1 bound as a dimer to the HIV-1 LTR kappa B element. *Nature structural biology*. 2003; 10 (10): 800-806.
- Gloerich M, Bos JL. Epac: defining a new mechanism for cAMP action. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2010; 50: 355-375.
- Goretzki PE, Frilling A, Simon D, Roehrer HD. Growth regulation of normal thyroids and thyroid tumors in man. Recent results in cancer research *Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer*. 1990; 118: 48-63.
- Gozu H, Avsar M, Bircan R, Claus M, Sahin S, Sezgin O, Deyneli O, et al. Two novel mutations in the sixth transmembrane segment of the thyrotropin receptor gene causing hyperfunctioning thyroid nodules. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2005; 15 (4): 389-397.
- Graef IA, Chen F, Crabtree GR. NFAT signaling in vertebrate development. *Current opinion in genetics & development*. 2001; 11 (5): 505-512.
- Grasberger H. Defects of thyroidal hydrogen peroxide generation in congenital hypothyroidism. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010; 322 (1-2): 99-106.
- Grasberger H, Van Sande J, Hag-Dahood Mahameed A, Tenenbaum-Rakover Y, Refetoff S. A familial thyrotropin (TSH) receptor mutation provides in vivo evidence that the inositol phosphates/Ca²⁺ cascade mediates TSH action on thyroid hormone synthesis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007; 92 (7): 2816-2820.

- Griesmann H, Ripka S, Pralle M, Ellenrieder V, Baumgart S, Buchholz M, Pilarsky C, et al. WNT5A-NFAT signaling mediates resistance to apoptosis in pancreatic cancer. *Neoplasia*. 2013; 15 (1): 11-22.
- Gross B, Misrahi M, Sar S, Milgrom E. Composite structure of the human thyrotropin receptor gene. *Biochemical and biophysical research communications*. 1991; 177 (2): 679-687.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry*. 1985; 260 (6): 3440-3450.
- Gudermann T, Grosse R, Schultz G. Contribution of receptor/G protein signaling to cell growth and transformation. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2000; 361 (4): 345-362.
- Gudermann T, Kalkbrenner F, Schultz G. Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 1996; 36: 429-459.
- Gwack Y, Feske S, Srikanth S, Hogan PG, Rao A. Signalling to transcription: store-operated Ca²⁺ entry and NFAT activation in lymphocytes. *Cell calcium*. 2007; 42 (2): 145-156.
- Haasnoot PC, Cupac D, Berkhout B. Inhibition of virus replication by RNA interference. *Journal of biomedical science*. 2003; 10 (6 Pt 1): 607-616.
- Hall R, Amos J, Garry R, Buxton RL. Thyroid-stimulating hormone response to synthetic thyrotrophin releasing hormone in man. *British medical journal*. 1970; 2 (5704): 274-277.
- Hamm HE. The many faces of G protein signaling. *The Journal of biological chemistry*. 1998; 273 (2): 669-672.
- Harris AR, Christianson D, Smith MS, Fang SL, Braverman LE, Vagenakis AG. The physiological role of thyrotropin-releasing hormone in the regulation of thyroid-stimulating hormone and prolactin secretion in the rat. *The Journal of clinical investigation*. 1978; 61 (2): 441-448.
- Harris CD, Ermak G, Davies KJ. Multiple roles of the DSCR1 (Adapt78 or RCAN1) gene and its protein product calcipressin 1 (or RCAN1) in disease. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2005; 62 (21): 2477-2486.
- Hashimoto H. Zur Kenntnis der lymphomatösen Veränderung der Schilddrüse (Struma lymphomatosa). *Archiv für klinische Chirurgie*. 1912; 97: 219-248.
- Hasle H, Clemmensen IH, Mikkelsen M. Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet*. 2000; 355 (9199): 165-169.
- Hayashizaki Y, Miyai K, Kato K, Matsubara K. Molecular cloning of the human thyrotropin-beta subunit gene. *FEBS letters*. 1985; 188 (2): 394-400.
- Haynik DM, Prayson RA. Immunohistochemical expression of cyclooxygenase 2 in follicular carcinomas of the thyroid. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2005; 129 (6): 736-741.
- Hegedüs L, Bonnema SJ, Bennedbaek FN. Management of simple nodular goiter: current status and future perspectives. *Endocrine reviews*. 2003; 24 (1): 102-132.
- Hepler JR, Kozasa T, Smrcka AV, Simon MI, Rhee SG, Sternweis PC, Gilman AG. Purification from Sf9 cells and characterization of recombinant Gq alpha and G11 alpha. Activation of purified phospholipase C isozymes by G alpha subunits. *The Journal of biological chemistry*. 1993; 268 (19): 14367-14375.

- Heuchel R, Radtke F, Georgiev O, Stark G, Aguet M, Schaffner W. The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. *The EMBO journal*. 1994; 13 (12): 2870-2875.
- Hicks DG, LiVolsi VA, Neidich JA, Puck JM, Kant JA. Clonal analysis of solitary follicular nodules in the thyroid. *The American journal of pathology*. 1990; 137 (3): 553-562.
- Hida T, Yatabe Y, Achiwa H, Muramatsu H, Kozaki K, Nakamura S, Ogawa M, et al. Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Cancer research*. 1998; 58 (17): 3761-3764.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. 1992; 10 (4): 413-417.
- Hirotsu H, Tuohy NA, Woo JT, Stern PH, Clipstone NA. The calcineurin/nuclear factor of activated T cells signaling pathway regulates osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. *The Journal of biological chemistry*. 2004; 279 (14): 13984-13992.
- Ho IC, Hodge MR, Rooney JW, Glimcher LH. The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. *Cell*. 1996; 85 (7): 973-983.
- Hoelting T, Tezelsman S, Siperstein AE, Duh QY, Clark OH. Thyrotropin stimulates invasion and growth of follicular thyroid cancer cells via PKC- rather than PKA-activation. *Biochemical and biophysical research communications*. 1993; 195 (3): 1230-1236.
- Hoelting T, Tezelsman S, Siperstein AE, Duh QY, Clark OH. Biphasic effects of thyrotropin on invasion and growth of papillary and follicular thyroid cancer in vitro. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 1995; 5 (1): 35-40.
- Hoelting T, Zielke A, Siperstein AE, Clark OH, Duh QY. Aberrations of growth factor control in metastatic follicular thyroid cancer in vitro. *Clinical & experimental metastasis*. 1994; 12 (4): 315-323.
- Hoffmann S, Maschuw K, Hassan I, Wunderlich A, Lingelbach S, Ramaswamy A, Hofbauer LC, et al. Functional thyrotropin receptor attenuates malignant phenotype of follicular thyroid cancer cells. *Endocrine*. 2006; 30 (1): 129-138.
- Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes & development*. 2003; 17 (18): 2205-2232.
- Hogan PG, Lewis RS, Rao A. Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. *Annual review of immunology*. 2010; 28: 491-533.
- Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, Gunter EW, Spencer CA, Braverman LE. Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002; 87 (2): 489-499.
- Holmes K, Chapman E, See V, Cross MJ. VEGF stimulates RCAN1.4 expression in endothelial cells via a pathway requiring Ca²⁺/calcineurin and protein kinase C-delta. *PloS one*. 2010; 5 (7): e11435.
- Holzapfel HP, Bergner B, Wonerow P, Paschke R. Expression of G(alpha)(s) proteins and TSH receptor signalling in hyperfunctioning thyroid nodules with TSH

- receptor mutations. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2002; 147 (1): 109-116.
- Huang Y, de la Chapelle A, Pellegata NS. Hypermethylation, but not LOH, is associated with the low expression of MT1G and CRABP1 in papillary thyroid carcinoma. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2003; 104 (6): 735-744.
- Huang Y, Prasad M, Lemon WJ, Hampel H, Wright FA, Kornacker K, LiVolsi V, et al. Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001; 98 (26): 15044-15049.
- Hubbard MJ, Klee CB. Functional domain structure of calcineurin A: mapping by limited proteolysis. *Biochemistry*. 1989; 28 (4): 1868-1874.
- Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995 [see comments]. *Cancer*. 1998; 83 (12): 2638-2648.
- Hungness ES, Pritts TA, Luo GJ, Hershko DD, Robb BW, Hasselgren PO. IL-1 β activates C/EBP- β and δ in human enterocytes through a mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2002; 34 (4): 382-395.
- Hurley JH. Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. *The Journal of biological chemistry*. 1999; 274 (12): 7599-7602.
- Hwang D, Scollard D, Byrne J, Levine E. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1998; 90 (6): 455-460.
- Iizuka M, Abe M, Shiiba K, Sasaki I, Sato Y. Down syndrome candidate region 1, a downstream target of VEGF, participates in endothelial cell migration and angiogenesis. *Journal of vascular research*. 2004; 41 (4): 334-344.
- Iñiguez MA, Martínez-Martínez S, Punzón C, Redondo JM, Fresno M. An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *The Journal of biological chemistry*. 2000; 275 (31): 23627-23635.
- Iñiguez MA, Rodríguez A, Volpert OV, Fresno M, Redondo JM. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. *Trends in molecular medicine*. 2003; 9 (2): 73-78.
- Ishii M, Kurachi Y. Physiological actions of regulators of G-protein signaling (RGS) proteins. *Life sciences*. 2003; 74 (2-3): 163-171.
- Ishikawa K, Taniguchi Y, Inoue K, Kurosumi K, Suzuki M. Immunocytochemical delineation of thyrotrophic area: origin of thyrotropin-releasing hormone in the median eminence. *Neuroendocrinology*. 1988; 47 (5): 384-388.
- Ito Y, Yoshida H, Nakano K, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Yokozawa T, et al. Cyclooxygenase-2 expression in thyroid neoplasms. *Histopathology*. 2003; 42 (5): 492-497.
- Jacoby E, Bouhelal R, Gerspacher M, Seuwen K. The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem*. 2006; 1 (8): 761-782.
- Jain J, Burgeon E, Badalian TM, Hogan PG, Rao A. A similar DNA-binding motif in NFAT family proteins and the Rel homology region. *The Journal of biological chemistry*. 1995; 270 (8): 4138-4145.

- Jain J, McCaffrey PG, Miner Z, Kerppola TK, Lambert JN, Verdine GL, Curran T, et al. The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature*. 1993a; 365 (6444): 352-355.
- Jain J, McCaffrey PG, Valge-Archer VE, Rao A. Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun. *Nature*. 1992; 356 (6372): 801-804.
- Jain J, Miner Z, Rao A. Analysis of the preexisting and nuclear forms of nuclear factor of activated T cells. *Journal of immunology*. 1993b; 151 (2): 837-848.
- Jauliac S, López-Rodríguez C, Shaw LM, Brown LF, Rao A, Toker A. The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. *Nature cell biology*. 2002; 4 (7): 540-544.
- Ji B, Liu Y, Zhang P, Wang Y, Wang G. COX-2 expression and tumor angiogenesis in thyroid carcinoma patients among northeast Chinese population-result of a single-center study. *International journal of medical sciences*. 2012; 9 (3): 237-242.
- Jiang H, Wu D, Simon MI. Activation of phospholipase C beta 4 by heterotrimeric GTP-binding proteins. *The Journal of biological chemistry*. 1994; 269 (10): 7593-7596.
- Jones K, Hibbert F, Keenan M. Glowing jellyfish, luminescence and a molecule called coelenterazine. *Trends in biotechnology*. 1999; 17 (12): 477-481.
- Kaczur V, Puskás LG, Takács M, Rácz IA, Szendroi A, Tóth S, Nagy Z, et al. Evolution of the thyrotropin receptor: a G protein coupled receptor with an intrinsic capacity to dimerize. *Molecular genetics and metabolism*. 2003; 78 (4): 275-290.
- Kajava AV, Vassart G, Wodak SJ. Modeling of the three-dimensional structure of proteins with the typical leucine-rich repeats. *Structure*. 1995; 3 (9): 867-877.
- Kajita S, Ruebel KH, Casey MB, Nakamura N, Lloyd RV. Role of COX-2, thromboxane A2 synthase, and prostaglandin I2 synthase in papillary thyroid carcinoma growth. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2005; 18 (2): 221-227.
- Kallal L, Gagnon AW, Penn RB, Benovic JL. Visualization of agonist-induced sequestration and down-regulation of a green fluorescent protein-tagged beta2-adrenergic receptor. *The Journal of biological chemistry*. 1998; 273 (1): 322-328.
- Kar P, Bakowski D, Di Capite J, Nelson C, Parekh AB. Different agonists recruit different stromal interaction molecule proteins to support cytoplasmic Ca²⁺ oscillations and gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012; 109 (18): 6969-6974.
- Kar P, Nelson C, Parekh AB. Selective activation of the transcription factor NFAT1 by calcium microdomains near Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channels. *The Journal of biological chemistry*. 2011; 286 (17): 14795-14803.
- Karger S, Krause K, Fuhrer D. [Molecular pathogenesis of thyroid tumors]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2006; 131 (30): 1671-1674.
- Kehlenbach RH, Dickmanns A, Gerace L. Nucleocytoplasmic shuttling factors including Ran and CRM1 mediate nuclear export of NFAT In vitro. *The Journal of cell biology*. 1998; 141 (4): 863-874.
- Kelly P, Casey PJ, Meigs TE. Biologic functions of the G12 subfamily of heterotrimeric G proteins: growth, migration, and metastasis. *Biochemistry*. 2007; 46 (23): 6677-6687.

- Kero J, Ahmed K, Wettchureck N, Tunaru S, Wintermantel T, Greiner E, Schütz G, et al. Thyrocyte-specific Gq/G11 deficiency impairs thyroid function and prevents goiter development. *The Journal of clinical investigation*. 2007; 117 (9): 2399-2407.
- Kim YA, Chang M, Park YJ, Kim JE. Detection of Survivin and COX-2 in Thyroid Carcinoma: Anaplastic Carcinoma Shows Overexpression of Nuclear Survivin and Low COX-2 Expression. *Korean journal of pathology*. 2012; 46 (1): 55-60.
- Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer research*. 2003; 63 (7): 1454-1457.
- Kimura T, Okajima F, Sho K, Kobayashi I, Kondo Y. Thyrotropin-induced hydrogen peroxide production in FRTL-5 thyroid cells is mediated not by adenosine 3',5'-monophosphate, but by Ca²⁺ signaling followed by phospholipase-A2 activation and potentiated by an adenosine derivative. *Endocrinology*. 1995; 136 (1): 116-123.
- Kimura T, Van Keymeulen A, Golstein J, Fusco A, Dumont JE, Roger PP. Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models. *Endocrine reviews*. 2001; 22 (5): 631-656.
- Kingsbury TJ, Cunningham KW. A conserved family of calcineurin regulators. *Genes & development*. 2000; 14 (13): 1595-1604.
- Klee CB, Draetta GF, Hubbard MJ. Calcineurin. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*. 1988; 61: 149-200.
- Klee CB, Krinks MH. Purification of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase inhibitory protein by affinity chromatography on activator protein coupled to Sepharose. *Biochemistry*. 1978; 17 (1): 120-126.
- Kleinau G, Jaeschke H, Worth CL, Mueller S, Gonzalez J, Paschke R, Krause G. Principles and determinants of G-protein coupling by the rhodopsin-like thyrotropin receptor. *PloS one*. 2010; 5 (3): e9745.
- Kloos RT, Eng C, Evans DB, Francis GL, Gagel RF, Gharib H, Moley JF, et al. Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2009; 19 (6): 565-612.
- Knoepfler PS. Myc goes global: new tricks for an old oncogene. *Cancer research*. 2007; 67 (11): 5061-5063.
- Kobayashi K, Shaver JK, Liang W, Siperstein AE, Duh QY, Clark OH. Increased phospholipase C activity in neoplastic thyroid membrane. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 1993; 3 (1): 25-29.
- Kobe B, Deisenhofer J. A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature*. 1995; 374 (6518): 183-186.
- Koenig A, Linhart T, Schlengemann K, Reutlinger K, Wegele J, Adler G, Singh G, et al. NFAT-induced histone acetylation relay switch promotes c-Myc-dependent growth in pancreatic cancer cells. *Gastroenterology*. 2010; 138 (3): 1189-1199 e1181-1182.
- Koga H, Sakisaka S, Ohishi M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Sasatomi K, Harada M, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation. *Hepatology*. 1999; 29 (3): 688-696.

- Koller KJ, Wolff RS, Warden MK, Zoeller RT. Thyroid hormones regulate levels of thyrotropin-releasing-hormone mRNA in the paraventricular nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987; 84 (20): 7329-7333.
- Kraemer SA, Meade EA, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide synthase gene structure: identification of the transcriptional start site and 5'-flanking regulatory sequences. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1992; 293 (2): 391-400.
- Krause K, Karger S, Schierhorn A, Poncin S, Many MC, Fuhrer D. Proteomic profiling of cold thyroid nodules. *Endocrinology*. 2007; 148 (4): 1754-1763.
- Krawczyk-Rusiecka K, Lewiński A. Cyclooxygenase-2 expression and its association with thyroid lesions. *Archives of medical science : AMS*. 2010; 6 (5): 653-657.
- Kretsinger RH. Structure and evolution of calcium-modulated proteins. *CRC critical reviews in biochemistry*. 1980; 8 (2): 119-174.
- Krohn K, Führer D, Bayer Y, Eszlinger M, Brauer V, Neumann S, Paschke R. Molecular pathogenesis of euthyroid and toxic multinodular goiter. *Endocrine reviews*. 2005; 26 (4): 504-524.
- Krohn K, Maier J, Paschke R. Mechanisms of disease: hydrogen peroxide, DNA damage and mutagenesis in the development of thyroid tumors. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism*. 2007; 3 (10): 713-720.
- Królicka A, Kobierzycki C, Pula B, Podhorska-Okolów M, Piotrowska A, Rzeszutko M, Rzeszutko W, et al. Comparison of metallothionein (MT) and Ki-67 antigen expression in benign and malignant thyroid tumours. *Anticancer research*. 2010; 30 (12): 4945-4949.
- Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, Fletcher JA. PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. *Science*. 2000; 289 (5483): 1357-1360.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227 (5259): 680-685.
- LaRochelle O, Gagné V, Charron J, Soh JW, Séguin C. Phosphorylation is involved in the activation of metal-regulatory transcription factor 1 in response to metal ions. *The Journal of biological chemistry*. 2001; 276 (45): 41879-41888.
- Laugwitz KL, Allgeier A, Offermanns S, Spicher K, Van Sande J, Dumont JE, Schultz G. The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996; 93 (1): 116-120.
- Laurent E, Mockel J, Van Sande J, Graff I, Dumont JE. Dual activation by thyrotropin of the phospholipase C and cyclic AMP cascades in human thyroid. *Molecular and cellular endocrinology*. 1987; 52 (3): 273-278.
- Leahy KP, Davies KJ, Dull M, Kort JJ, Lawrence KW, Crawford DR. adapt78, a stress-inducible mRNA, is related to the glucose-regulated protein family of genes. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1999; 368 (1): 67-74.
- Ledent C, Denef JF, Cottecchia S, Lefkowitz R, Dumont J, Vassart G, Parmentier M. Costimulation of adenylyl cyclase and phospholipase C by a mutant alpha 1B-adrenergic receptor transgene promotes malignant transformation of thyroid follicular cells. *Endocrinology*. 1997; 138 (1): 369-378.
- Lee DU, Avni O, Chen L, Rao A. A distal enhancer in the interferon-gamma (IFN-gamma) locus revealed by genome sequence comparison. *The Journal of biological chemistry*. 2004; 279 (6): 4802-4810.

- Lee HJ, Kim YS, Sato Y, Cho YJ. RCAN1-4 knockdown attenuates cell growth through the inhibition of Ras signaling. *FEBS letters*. 2009; 583 (15): 2557-2564.
- Lee KJ, Jung YS, Kim WH, Yoon TI, Joo HJ, Soh EY. Cyclooxygenase-2 expression in human thyroid disease. *Journal of endocrinological investigation*. 2008; 31 (2): 111-118.
- Li X, Chen H, Epstein PN. Metallothionein protects islets from hypoxia and extends islet graft survival by scavenging most kinds of reactive oxygen species. *The Journal of biological chemistry*. 2004; 279 (1): 765-771.
- Lim D, Jocelyn KM, Yip GW, Bay BH. Silencing the Metallothionein-2A gene inhibits cell cycle progression from G1- to S-phase involving ATM and cdc25A signaling in breast cancer cells. *Cancer letters*. 2009; 276 (1): 109-117.
- Lin HY, Michtalik HJ, Zhang S, Andersen TT, Van Riper DA, Davies KK, Ermak G, et al. Oxidative and calcium stress regulate DSCR1 (Adapt78/MCIP1) protein. *Free radical biology & medicine*. 2003; 35 (5): 528-539.
- Lin JD, Ho YS, Chang HY, Weng HF. The role of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in follicular thyroid cancer cell line CGTH W-1. *In vitro cellular & developmental biology Animal*. 1995; 31 (11): 817-821.
- Lin RY. Thyroid cancer stem cells. *Nature reviews Endocrinology*. 2011; 7 (10): 609-616.
- Liu JF, Zhao SH, Wu SS. Depleting NFAT1 expression inhibits the ability of invasion and migration of human lung cancer cells. *Cancer cell international*. 2013; 13 (1): 41.
- Liu ZM, Chen GG, Shum CK, Vlantis AC, Cherian MG, Koropatnick J, van Hasselt CA. Induction of functional MT1 and MT2 isoforms by calcium in anaplastic thyroid carcinoma cells. *FEBS letters*. 2007; 581 (13): 2465-2472.
- Liu ZM, Hasselt CA, Song FZ, Vlantis AC, Cherian MG, Koropatnick J, Chen GG. Expression of functional metallothionein isoforms in papillary thyroid cancer. *Molecular and cellular endocrinology*. 2009; 302 (1): 92-98.
- Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC: *Biochemie & Pathobiochemie*. 8. Aufl, 2007. Springer Science+Business Media S.A., Berlin.
- Loh C, Shaw KT, Carew J, Viola JP, Luo C, Perrino BA, Rao A. Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *The Journal of biological chemistry*. 1996; 271 (18): 10884-10891.
- Loosfelt H, Pichon C, Jolivet A, Misrahi M, Caillou B, Jamous M, Vannier B, et al. Two-subunit structure of the human thyrotropin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992; 89 (9): 3765-3769.
- Lorenz S, Aust G, Krohn K. Ca-binding protein expression in primary human thyrocytes. *Biochimica et biophysica acta*. 2013; 1833 (12): 2703-2713.
- Lu C, Zhao L, Ying H, Willingham MC, Cheng SY. Growth activation alone is not sufficient to cause metastatic thyroid cancer in a mouse model of follicular thyroid carcinoma. *Endocrinology*. 2010; 151 (4): 1929-1939.
- Lynes MA, Borghesi LA, Youn J, Olson EA. Immunomodulatory activities of extracellular metallothionein. I. Metallothionein effects on antibody production. *Toxicology*. 1993; 85 (2-3): 161-177.
- Lyons J, Landis CA, Harsh G, Vallar L, Grünewald K, Feichtinger H, Duh QY, et al. Two G protein oncogenes in human endocrine tumors. *Science*. 1990; 249 (4969): 655-659.

- Macian F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nature reviews Immunology*. 2005; 5 (6): 472-484.
- Macián F, García-Cózar F, Im SH, Horton HF, Byrne MC, Rao A. Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell*. 2002; 109 (6): 719-731.
- Mancarella S, Potireddy S, Wang Y, Gao H, Gandhirajan RK, Autieri M, Scalia R, et al. Targeted STIM deletion impairs calcium homeostasis, NFAT activation, and growth of smooth muscle. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2013; 27 (3): 893-906.
- Mancini M, Toker A. NFAT proteins: emerging roles in cancer progression. *Nature reviews Cancer*. 2009; 9 (11): 810-820.
- Masuo T, Okamura S, Zhang Y, Mori M. Cyclosporine A inhibits colorectal cancer proliferation probably by regulating expression levels of c-Myc, p21(WAF1/CIP1) and proliferating cell nuclear antigen. *Cancer letters*. 2009; 285 (1): 66-72.
- Matsumoto H, Sakamoto A, Fujiwara M, Yano Y, Shishido-Hara Y, Fujioka Y, Kamma H. Decreased expression of the thyroid-stimulating hormone receptor in poorly-differentiated carcinoma of the thyroid. *Oncology reports*. 2008; 19 (6): 1405-1411.
- Matsuo K, Friedman E, Gejman PV, Fagin JA. The thyrotropin receptor (TSH-R) is not an oncogene for thyroid tumors: structural studies of the TSH-R and the alpha-subunit of Gs in human thyroid neoplasms. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1993; 76 (6): 1446-1451.
- Meier-Kriesche HU, Li S, Gruessner RW, Fung JJ, Bustami RT, Barr ML, Leichtman AB. Immunosuppression: evolution in practice and trends, 1994-2004. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2006; 6 (5 Pt 2): 1111-1131.
- Mendes RA, Carvalho JF, Waal I. An overview on the expression of cyclooxygenase-2 in tumors of the head and neck. *Oral oncology*. 2009; 45 (10): e124-128.
- Meng W, Scriba PC. Jodversorgung in Deutschland: Probleme und erforderliche Maßnahmen - Update 2002. *Deutsches Ärzteblatt*. 2002; 99 (39).
- Milligan G, Kostenis E. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *British journal of pharmacology*. 2006; 147 Suppl 1: S46-55.
- Minami T, Horiuchi K, Miura M, Abid MR, Takabe W, Noguchi N, Kohro T, et al. Vascular endothelial growth factor- and thrombin-induced termination factor, Down syndrome critical region-1, attenuates endothelial cell proliferation and angiogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 2004; 279 (48): 50537-50554.
- Mirell CJ, Yanagisawa M, Lau R, Pekary AE, Chin WW, Hershman JM. Influence of thyroidal status on pituitary content of thyrotropin beta- and alpha-subunit, growth hormone, and prolactin messenger ribonucleic acids. *Molecular endocrinology*. 1987; 1 (6): 408-412.
- Misrahi M, Loosfelt H, Atger M, Sar S, Guiochon-Mantel A, Milgrom E. Cloning, sequencing and expression of human TSH receptor. *Biochemical and biophysical research communications*. 1990; 166 (1): 394-403.
- Miyashita H, Sato Y. Metallothionein 1 is a downstream target of vascular endothelial zinc finger 1 (VEZF1) in endothelial cells and participates in the regulation of

- angiogenesis. *Endothelium : journal of endothelial cell research*. 2005; 12 (4): 163-170.
- Mombaerts P. Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors. *Science*. 1999; 286 (5440): 707-711.
- Mori K, Yoshida K, Hoshikawa S, Ito S, Yoshida M, Satoh M, Watanabe C. Effects of perinatal exposure to low doses of cadmium or methylmercury on thyroid hormone metabolism in metallothionein-deficient mouse neonates. *Toxicology*. 2006; 228 (1): 77-84.
- Morley JE. Neuroendocrine control of thyrotropin secretion. *Endocrine reviews*. 1981; 2 (4): 396-436.
- Motiani RK, Abdullaev IF, Trebak M. A novel native store-operated calcium channel encoded by Orai3: selective requirement of Orai3 versus Orai1 in estrogen receptor-positive versus estrogen receptor-negative breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry*. 2010; 285 (25): 19173-19183.
- Motiani RK, Zhang X, Harmon KE, Keller RS, Matrougui K, Bennett JA, Trebak M. Orai3 is an estrogen receptor alpha-regulated Ca(2)(+) channel that promotes tumorigenesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2013; 27 (1): 63-75.
- Mrozek E, Kloos RT, Ringel MD, Kresty L, Snider P, Arbogast D, Kies M, et al. Phase II study of celecoxib in metastatic differentiated thyroid carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006; 91 (6): 2201-2204.
- Müller MR, Rao A. NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nature reviews Immunology*. 2010; 10 (9): 645-656.
- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology*. 1987; 155: 335-350.
- Musarò A, McCullagh KJ, Naya FJ, Olson EN, Rosenthal N. IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature*. 1999; 400 (6744): 581-585.
- Nagaiah G, Hossain A, Mooney CJ, Parmentier J, Remick SC. Anaplastic thyroid cancer: a review of epidemiology, pathogenesis, and treatment. *Journal of oncology*. 2011; 2011: 542358.
- Nagayama Y, Kaufman KD, Seto P, Rapoport B. Molecular cloning, sequence and functional expression of the cDNA for the human thyrotropin receptor. *Biochemical and biophysical research communications*. 1989; 165 (3): 1184-1190.
- Nagayama Y, Rapoport B. The thyrotropin receptor 25 years after its discovery: new insight after its molecular cloning. *Molecular endocrinology*. 1992; 6 (2): 145-156.
- Nartey N, Cherian MG, Banerjee D. Immunohistochemical localization of metallothionein in human thyroid tumors. *The American journal of pathology*. 1987; 129 (1): 177-182.
- Neal JW, Clipstone NA. A constitutively active NFATc1 mutant induces a transformed phenotype in 3T3-L1 fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*. 2003; 278 (19): 17246-17254.
- Neumann S, Krause G, Claus M, Paschke R. Structural determinants for g protein activation and selectivity in the second intracellular loop of the thyrotropin receptor. *Endocrinology*. 2005; 146 (1): 477-485.

- Neumann S, Schuchardt K, Reske A, Reske A, Emmrich P, Paschke R. Lack of correlation for sodium iodide symporter mRNA and protein expression and analysis of sodium iodide symporter promoter methylation in benign cold thyroid nodules. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2004; 14 (2): 99-111.
- Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nature reviews Endocrinology*. 2011; 7 (10): 569-580.
- Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW, 2nd, Tallini G, Kroll TG, et al. RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003; 88 (5): 2318-2326.
- Nillni EA. Regulation of the hypothalamic thyrotropin releasing hormone (TRH) neuron by neuronal and peripheral inputs. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2010; 31 (2): 134-156.
- Nowak N. Identifizierung Gq/11-vermittelter Signalwege des Thyreotropin-Rezeptors [Diplomarbeit]: Philipps-Universität Marburg; 2005.
- Núñez Miguel R, Sanders J, Chirgadze DY, Blundell TL, Furmaniak J, Rees Smith B. FSH and TSH binding to their respective receptors: similarities, differences and implication for glycoprotein hormone specificity. *Journal of molecular endocrinology*. 2008; 41 (3): 145-164.
- Núñez Miguel R, Sanders J, Jeffreys J, Depraetere H, Evans M, Richards T, Blundell TL, et al. Analysis of the thyrotropin receptor-thyrotropin interaction by comparative modeling. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2004; 14 (12): 991-1011.
- Nykänen A, Haley B, Zamore PD. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*. 2001; 107 (3): 309-321.
- Oh-Hora M, Yamashita M, Hogan PG, Sharma S, Lamperti E, Chung W, Prakriya M, et al. Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance. *Nature immunology*. 2008; 9 (4): 432-443.
- Oh M, Dey A, Gerard RD, Hill JA, Rothermel BA. The CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBPbeta) cooperates with NFAT to control expression of the calcineurin regulatory protein RCAN1-4. *The Journal of biological chemistry*. 2010; 285 (22): 16623-16631.
- Okamura H, Aramburu J, García-Rodríguez C, Viola JP, Raghavan A, Tahliliani M, Zhang X, et al. Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Molecular cell*. 2000; 6 (3): 539-550.
- Oppenheimer JH, Schwartz HL, Koerner D, Surks MI. Limited binding capacity sites for L-triiodothyronine in rat liver nuclei. Nuclear-cytoplasmic interrelation, binding constants, and cross-reactivity with L-thyroxine. *The Journal of clinical investigation*. 1974; 53 (3): 768-777.
- Otto JC, Smith WL. Prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2. *Journal of lipid mediators and cell signalling*. 1995; 12 (2-3): 139-156.
- Pain RW. In vitro testing of thyroid function: a review. *Pathology*. 1975; 7 (1): 1-12.

- Pani B, Bollimuntha S, Singh BB. The TR (i)P to Ca(2)(+) signaling just got STIMy: an update on STIM1 activated TRPC channels. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2012; 17: 805-823.
- Park CY, Hoover PJ, Mullins FM, Bachhawat P, Covington ED, Raunser S, Walz T, et al. STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell*. 2009; 136 (5): 876-890.
- Park D, Jhon DY, Lee CW, Lee KH, Rhee SG. Activation of phospholipase C isozymes by G protein beta gamma subunits. *The Journal of biological chemistry*. 1993; 268 (7): 4573-4576.
- Park JD, Liu Y, Klaassen CD. Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals(1). *Toxicology*. 2001; 163 (2-3): 93-100.
- Parma J, Duprez L, Van Sande J, Cochaux P, Gervy C, Mockel J, Dumont J, et al. Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas. *Nature*. 1993; 365 (6447): 649-651.
- Paschke R. Molecular pathogenesis of nodular goiter. *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft für Chirurgie*. 2011; 396 (8): 1127-1136.
- Paschke R, Ludgate M. The thyrotropin receptor in thyroid diseases. *The New England journal of medicine*. 1997; 337 (23): 1675-1681.
- Patel KN, Shaha AR. Poorly differentiated and anaplastic thyroid cancer. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center*. 2006; 13 (2): 119-128.
- Patja K, Pukkala E, Sund R, Iivanainen M, Kaski M. Cancer incidence of persons with Down syndrome in Finland: a population-based study. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2006; 118 (7): 1769-1772.
- Paulsen, Waschke: Sobotta Atlas der Anatomie des Menschen. 23 Aufl, 2010. © Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München.
- Pazos-Moura CC, Ortega-Carvalho TM, Gaspar de Moura E. The autocrine/paracrine regulation of thyrotropin secretion. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2003; 13 (2): 167-175.
- Pedersen MØ, Larsen A, Stoltenberg M, Penkowa M. The role of metallothionein in oncogenesis and cancer prognosis. *Progress in histochemistry and cytochemistry*. 2009; 44 (1): 29-64.
- Płoski R, Szymański K, Bednarczuk T. The genetic basis of graves' disease. *Current genomics*. 2011; 12 (8): 542-563.
- Pomérance M, Mockey M, Young J, Quillard J, Blondeau JP. Expression, hormonal regulation, and subcellular localization of CCAAT/enhancer-binding protein-beta in rat and human thyrocytes. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2005; 15 (3): 197-204.
- Portella G, Vitagliano D, Li Z, Sferratore F, Santoro M, Vecchio G, Fusco A. TPA induces a block of differentiation and increases the susceptibility to neoplastic transformation of a rat thyroid epithelial cell line. *Oncology research*. 1998; 10 (9): 441-447.
- Prakriya M, Feske S, Gwack Y, Srikanth S, Rao A, Hogan PG. Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature*. 2006; 443 (7108): 230-233.
- Prante O, Maschauer S, Fremont V, Reinfelder J, Stoeck R, Szkudlinski M, Weintraub B, et al. Regulation of uptake of 18F-FDG by a follicular human thyroid cancer cell line with mutation-activated K-ras. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2009; 50 (8): 1364-1370.

- Puck TT, Marcus PI. A Rapid Method for Viable Cell Titration and Clone Production with Hela Cells in Tissue Culture: The Use of X-Irradiated Cells to Supply Conditioning Factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1955; 41 (7): 432-437.
- Puck TT, Marcus PI, Cieciura SJ. Clonal growth of mammalian cells in vitro; growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer. *The Journal of experimental medicine*. 1956; 103 (2): 273-283.
- Qin L, Zhao D, Liu X, Nagy JA, Hoang MV, Brown LF, Dvorak HF, et al. Down syndrome candidate region 1 isoform 1 mediates angiogenesis through the calcineurin-NFAT pathway. *Molecular cancer research : MCR*. 2006; 4 (11): 811-820.
- Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annual review of immunology*. 1997; 15: 707-747.
- Rao AS, Goretzki PE, Köhrle J, Brabant G. Letter Re: Id1 gene expression in hyperplastic and neoplastic thyroid tissues. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005; 90 (10): 5906.
- Renart J, Reiser J, Stark GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979; 76 (7): 3116-3120.
- Rengarajan J, Mowen KA, McBride KD, Smith ED, Singh H, Glimcher LH. Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression. *The Journal of experimental medicine*. 2002; 195 (8): 1003-1012.
- Reynolds LE, Watson AR, Baker M, Jones TA, D'Amico G, Robinson SD, Joffre C, et al. Tumour angiogenesis is reduced in the Tc1 mouse model of Down's syndrome. *Nature*. 2010; 465 (7299): 813-817.
- Rich PR, Mischis LA, Purton S, Wiskich JT. The sites of interaction of triphenyltetrazolium chloride with mitochondrial respiratory chains. *FEMS microbiology letters*. 2001; 202 (2): 181-187.
- Riedel C, Levy O, Carrasco N. Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter by thyrotropin. *The Journal of biological chemistry*. 2001; 276 (24): 21458-21463.
- Rieu M, Portos C, Lissak B, Laplanche S, Sambor B, Berrod JL, Fombour JP. Relationship of antibodies to thyrotropin receptors and to thyroid ultrasonographic volume in euthyroid and hypothyroid patients with autoimmune thyroiditis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1996; 81 (2): 641-645.
- Ringel MD, Saji M, Schwindinger WF, Segev D, Zeiger MA, Levine MA. Absence of activating mutations of the genes encoding the alpha-subunits of G11 and Gq in thyroid neoplasia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1998; 83 (2): 554-559.
- Rinne A, Banach K, Blatter LA. Regulation of nuclear factor of activated T cells (NFAT) in vascular endothelial cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2009; 47 (3): 400-410.
- Rinne A, Kapur N, Molkentin JD, Pogwizd SM, Bers DM, Banach K, Blatter LA. Isoform- and tissue-specific regulation of the Ca(2+)-sensitive transcription factor NFAT in cardiac myocytes and heart failure. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2010; 298 (6): H2001-2009.

- Rizzo MT. Cyclooxygenase-2 in oncogenesis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2011; 412 (9-10): 671-687.
- Robbs BK, Cruz AL, Werneck MB, Mognol GP, Viola JP. Dual roles for NFAT transcription factor genes as oncogenes and tumor suppressors. *Molecular and cellular biology*. 2008; 28 (23): 7168-7181.
- Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *Journal of immunological methods*. 1991; 142 (2): 257-265.
- Roger PP, Dumont JE. Factors controlling proliferation and differentiation of canine thyroid cells cultured in reduced serum conditions: effects of thyrotropin, cyclic AMP and growth factors. *Molecular and cellular endocrinology*. 1984; 36 (1-2): 79-93.
- Rosenbaum DM, Rasmussen SG, Kobilka BK. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2009; 459 (7245): 356-363.
- Rothermel B, Vega RB, Yang J, Wu H, Bassel-Duby R, Williams RS. A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2000; 275 (12): 8719-8725.
- Rousseau-Merck MF, Misrahi M, Loosfelt H, Atger M, Milgrom E, Berger R. Assignment of the human thyroid stimulating hormone receptor (TSHR) gene to chromosome 14q31. *Genomics*. 1990; 8 (2): 233-236.
- Ruiz-Riol M, Martínez-Arconada MJ, Alonso N, Soldevila B, Marchena D, Armengol MP, Sanmartí A, et al. Overexpression of metallothionein I/II: a new feature of thyroid follicular cells in Graves' disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012; 97 (2): 446-454.
- Rumi-Masante J, Rusinga FI, Lester TE, Dunlap TB, Williams TD, Dunker AK, Weis DD, et al. Structural basis for activation of calcineurin by calmodulin. *Journal of molecular biology*. 2012; 415 (2): 307-317.
- Rusnak F, Mertz P. Calcineurin: form and function. *Physiological reviews*. 2000; 80 (4): 1483-1521.
- Ryeom S, Baek KH, Rioth MJ, Lynch RC, Zaslavsky A, Birsner A, Yoon SS, et al. Targeted deletion of the calcineurin inhibitor DSCR1 suppresses tumor growth. *Cancer cell*. 2008; 13 (5): 420-431.
- Sabolić I, Breljak D, Skarica M, Herak-Kramberger CM. Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*. 2010; 23 (5): 897-926.
- Sairam MR, Li CH. Human pituitary thyrotropin. The primary structure of the alpha and beta subunits. *Canadian journal of biochemistry*. 1977; 55 (7): 755-760.
- Saiselet M, Floor S, Tarabichi M, Dom G, Hébrant A, van Staveren WC, Maenhaut C. Thyroid cancer cell lines: an overview. *Frontiers in endocrinology*. 2012; 3: 133.
- Salomon Y, Londos C, Rodbell M. A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Analytical biochemistry*. 1974; 58 (2): 541-548.
- Samuels HH, Tsai JS. Thyroid hormone action in cell culture: demonstration of nuclear receptors in intact cells and isolated nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1973; 70 (12): 3488-3492.

- Sanders J, Chirgadze DY, Sanders P, Baker S, Sullivan A, Bhardwaja A, Bolton J, et al. Crystal structure of the TSH receptor in complex with a thyroid-stimulating autoantibody. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2007; 17 (5): 395-410.
- Sanders P, Young S, Sanders J, Kabelis K, Baker S, Sullivan A, Evans M, et al. Crystal structure of the TSH receptor (TSHR) bound to a blocking-type TSHR autoantibody. *Journal of molecular endocrinology*. 2011; 46 (2): 81-99.
- Santin AP, Souza AF, Brum LS, Furlanetto TW. Validation of reference genes for normalizing gene expression in real-time quantitative reverse transcription PCR in human thyroid cells in primary culture treated with progesterone and estradiol. *Molecular biotechnology*. 2013; 54 (2): 278-282.
- Scarpino S, Duranti E, Stoppacciaro A, Pillozzi E, Natoli G, Sciacchitano S, Luciani E, et al. COX-2 is induced by HGF stimulation in Met-positive thyroid papillary carcinoma cells and is involved in tumour invasiveness. *The Journal of pathology*. 2009; 218 (4): 487-494.
- Schmid KW. [Molecular pathology of thyroid tumors]. *Der Pathologe*. 2010; 31 Suppl 2: 229-233.
- Schmidt A, Ladage D, Schinköthe T, Klausmann U, Ulrichs C, Klinz FJ, Brixius K, et al. Basic fibroblast growth factor controls migration in human mesenchymal stem cells. *Stem cells*. 2006; 24 (7): 1750-1758.
- Schönberger J, Bauer J, Spruss T, Weber G, Chahoud I, Eilles C, Grimm D. Establishment and characterization of the follicular thyroid carcinoma cell line ML-1. *J Mol Med (Berl)*. 2000; 78 (2): 102-110.
- Schweizer U, Chiu J, Köhrle J. Peroxides and peroxide-degrading enzymes in the thyroid. *Antioxidants & redox signaling*. 2008; 10 (9): 1577-1592.
- Schweppe RE, Klopper JP, Korch C, Pugazhenthir U, Benezra M, Knauf JA, Fagin JA, et al. Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell lines reveals cross-contamination resulting in cell line redundancy and misidentification. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008; 93 (11): 4331-4341.
- Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer research*. 1988; 48 (17): 4827-4833.
- Seetharamaiah GS, Kurosky A, Desai RK, Dallas JS, Prabhakar BS. A recombinant extracellular domain of the thyrotropin (TSH) receptor binds TSH in the absence of membranes. *Endocrinology*. 1994; 134 (2): 549-554.
- Segerson TP, Hoefler H, Childers H, Wolfe HJ, Wu P, Jackson IM, Lechan RM. Localization of thyrotropin-releasing hormone prohormone messenger ribonucleic acid in rat brain in situ hybridization. *Endocrinology*. 1987a; 121 (1): 98-107.
- Segerson TP, Kauer J, Wolfe HC, Mobtaker H, Wu P, Jackson IM, Lechan RM. Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science*. 1987b; 238 (4823): 78-80.
- Shah BH, Farshori MP, Jambusaria A, Catt KJ. Roles of Src and epidermal growth factor receptor transactivation in transient and sustained ERK1/2 responses to gonadotropin-releasing hormone receptor activation. *The Journal of biological chemistry*. 2003; 278 (21): 19118-19126.

- Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crabtree GR. Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science*. 1988; 241 (4862): 202-205.
- Shen T, Liu Y, Cseresnyés Z, Hawkins A, Randall WR, Schneider MF. Activity- and calcineurin-independent nuclear shuttling of NFATc1, but not NFATc3, in adult skeletal muscle fibers. *Molecular biology of the cell*. 2006; 17 (4): 1570-1582.
- Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer research*. 1998; 58 (2): 362-366.
- Sheng H, Shao J, Washington MK, DuBois RN. Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry*. 2001; 276 (21): 18075-18081.
- Sherman SI. Targeted therapies for thyroid tumors. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2011; 24 Suppl 2: S44-52.
- Sheu SY, Grabellus F, Schwertheim S, Mann K, Ensinger C, Ofner D, Bockhorn M, et al. COX-2 expression in highly aggressive thyroid malignancies - indication for a possible therapeutic option? *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*. 2009; 41 (4): 314-319.
- Shi Y, Zou M, Farid NR. Expression of thyrotrophin receptor gene in thyroid carcinoma is associated with a good prognosis. *Clinical endocrinology*. 1993; 39 (3): 269-274.
- Shin J, Lee JC, Baek KH. A single extra copy of Dscr1 improves survival of mice developing spontaneous lung tumors through suppression of tumor angiogenesis. *Cancer letters*. 2013.
- Siamakpour-Reihani S, Caster J, Bandhu Nepal D, Courtwright A, Hilliard E, Usary J, Ketelsen D, et al. The role of calcineurin/NFAT in SFRP2 induced angiogenesis--a rationale for breast cancer treatment with the calcineurin inhibitor tacrolimus. *PloS one*. 2011; 6 (6): e20412.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. *Cancer statistics, 2012*. CA: a cancer journal for clinicians. 2012; 62 (1): 10-29.
- Siironen P, Ristimäki A, Narko K, Nordling S, Louhimo J, Andersson S, Haapiainen R, et al. VEGF-C and COX-2 expression in papillary thyroid cancer. *Endocrine-related cancer*. 2006; 13 (2): 465-473.
- Siironen P, Ristimäki A, Nordling S, Louhimo J, Haapiainen R, Haglund C. Expression of COX-2 is increased with age in papillary thyroid cancer. *Histopathology*. 2004; 44 (5): 490-497.
- Simon MI, Strathmann MP, Gautam N. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science*. 1991; 252 (5007): 802-808.
- Singh J, Hunt P, Eggo MC, Sheppard MC, Kirk CJ, Michell RH. Thyroid-stimulating hormone rapidly stimulates inositol polyphosphate formation in FRTL-5 thyrocytes without activating phosphoinositidase C. *The Biochemical journal*. 1996; 316 (Pt 1): 175-182.
- Smirnova IV, Bittel DC, Ravindra R, Jiang H, Andrews GK. Zinc and cadmium can promote rapid nuclear translocation of metal response element-binding transcription factor-1. *The Journal of biological chemistry*. 2000; 275 (13): 9377-9384.

- Song Y, Massart C, Chico-Galdo V, Jin L, De Maertelaer V, Decoster C, Dumont JE, et al. Species specific thyroid signal transduction: conserved physiology, divergent mechanisms. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010; 319 (1-2): 56-62.
- Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology*. 1975; 98 (3): 503-517.
- Specht MC, Tucker ON, Hovever M, Gonzalez D, Teng L, Fahey TJ, 3rd. Cyclooxygenase-2 expression in thyroid nodules. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002; 87 (1): 358-363.
- Spencer CA, Groudine M. Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. *Advances in cancer research*. 1991; 56: 1-48.
- Srikanth S, Gwack Y. Orail-NFAT signalling pathway triggered by T cell receptor stimulation. *Molecules and cells*. 2013; 35 (3): 182-194.
- Stathatos N, Bourdeau I, Espinosa AV, Saji M, Vasko VV, Burman KD, Stratakis CA, et al. KiSS-1/G protein-coupled receptor 54 metastasis suppressor pathway increases myocyte-enriched calcineurin interacting protein 1 expression and chronically inhibits calcineurin activity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005; 90 (9): 5432-5440.
- Stemmer PM, Klee CB. Dual calcium ion regulation of calcineurin by calmodulin and calcineurin B. *Biochemistry*. 1994; 33 (22): 6859-6866.
- Stroud JC, Chen L. Structure of NFAT bound to DNA as a monomer. *Journal of molecular biology*. 2003; 334 (5): 1009-1022.
- Sukumaran P, Löf C, Kemppainen K, Kankaanpää P, Pulli I, Näsman J, Viitanen T, et al. Canonical transient receptor potential channel 2 (TRPC2) as a major regulator of calcium homeostasis in rat thyroid FRTL-5 cells: importance of protein kinase C delta (PKCdelta) and stromal interaction molecule 2 (STIM2). *The Journal of biological chemistry*. 2012; 287 (53): 44345-44360.
- Tanaka K, Inoue H, Miki H, Masuda E, Kitaichi M, Komaki K, Uyama T, et al. Relationship between prognostic score and thyrotropin receptor (TSH-R) in papillary thyroid carcinoma: immunohistochemical detection of TSH-R. *British journal of cancer*. 1997; 76 (5): 594-599.
- Taussig R, Tang WJ, Hepler JR, Gilman AG. Distinct patterns of bidirectional regulation of mammalian adenylyl cyclases. *The Journal of biological chemistry*. 1994; 269 (8): 6093-6100.
- Taylor SS, Knighton DR, Zheng J, Ten Eyck LF, Sowadski JM. Structural framework for the protein kinase family. *Annual review of cell biology*. 1992; 8: 429-462.
- Thiel M, Lis A, Penner R. STIM2 drives Ca²⁺ oscillations through store-operated Ca²⁺ entry caused by mild store depletion. *The Journal of physiology*. 2013; 591 (Pt 6): 1433-1445.
- Toda S, Aoki S, Uchihashi K, Matsunobu A, Yamamoto M, Ootani A, Yamasaki F, et al. Culture models for studying thyroid biology and disorders. *ISRN endocrinology*. 2011; 2011: 275782.
- Tonacchera M, Viacava P, Agretti P, de Marco G, Perri A, di Cosmo C, de Servi M, et al. Benign nonfunctioning thyroid adenomas are characterized by a defective targeting to cell membrane or a reduced expression of the sodium iodide symporter protein. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002; 87 (1): 352-357.

- Törnquist K, Forss L, Lamberg-Allardt C. Effects of vitamin D3 metabolites on thyrotropin secretion from rat pituitary cells in culture. *Journal of endocrinological investigation*. 1990; 13 (5): 391-395.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979; 76 (9): 4350-4354.
- Tsuji M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*. 1995; 83 (3): 493-501.
- Ulrich JD, Kim MS, Houlihan PR, Shutov LP, Mohapatra DP, Strack S, Usachev YM. Distinct activation properties of the nuclear factor of activated T-cells (NFAT) isoforms NFATc3 and NFATc4 in neurons. *The Journal of biological chemistry*. 2012; 287 (45): 37594-37609.
- Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Advances in physiology education*. 2005; 29 (3): 151-159.
- Van Heuverswyn B, Leriche A, Van Sande J, Dumont JE, Vassart G. Transcriptional control of thyroglobulin gene expression by cyclic AMP. *FEBS letters*. 1985; 188 (2): 192-196.
- Van Hooijdonk CA, Glade CP, Van Erp PE. TO-PRO-3 iodide: a novel HeNe laser-excitable DNA stain as an alternative for propidium iodide in multiparameter flow cytometry. *Cytometry*. 1994; 17 (2): 185-189.
- van Staveren WC, Solís DW, Delys L, Duprez L, Andry G, Franc B, Thomas G, et al. Human thyroid tumor cell lines derived from different tumor types present a common dedifferentiated phenotype. *Cancer research*. 2007; 67 (17): 8113-8120.
- Vannier B, Peyton M, Boulay G, Brown D, Qin N, Jiang M, Zhu X, et al. Mouse *trp2*, the homologue of the human *trpc2* pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion-activated capacitative Ca^{2+} entry channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999; 96 (5): 2060-2064.
- Vassart G, Dumont JE. The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocrine reviews*. 1992; 13 (3): 596-611.
- Vesely PW, Staber PB, Hoefler G, Kenner L. Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins. *Mutation research*. 2009; 682 (1): 7-12.
- Wang D, Feng JF, Zeng P, Yang YH, Luo J, Yang YW. Total oxidant/antioxidant status in sera of patients with thyroid cancers. *Endocrine-related cancer*. 2011; 18 (6): 773-782.
- Weiss SJ, Philp NJ, Ambesi-Impiombato FS, Grollman EF. Thyrotropin-stimulated iodide transport mediated by adenosine 3',5'-monophosphate and dependent on protein synthesis. *Endocrinology*. 1984a; 114 (4): 1099-1107.
- Weiss SJ, Philp NJ, Grollman EF. Effect of thyrotropin on iodide efflux in FRTL-5 cells mediated by Ca^{2+} . *Endocrinology*. 1984b; 114 (4): 1108-1113.
- Wettschureck N, Offermanns S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiological reviews*. 2005; 85 (4): 1159-1204.
- Winkler F, Kleinau G, Tarnow P, Rediger A, Grohmann L, Gaetjens I, Krause G, et al. A new phenotype of nongoitrous and nonautoimmune hyperthyroidism caused by a heterozygous thyrotropin receptor mutation in transmembrane helix 6. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010; 95 (8): 3605-3610.

- Włostowski T. Involvement of metallothionein and copper in cell proliferation. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*. 1993; 6 (2): 71-76.
- Wolff H, Saukkonen K, Anttila S, Karjalainen A, Vainio H, Ristimäki A. Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer research*. 1998; 58 (22): 4997-5001.
- Wonerow P, Neumann S, Gudermann T, Paschke R. Thyrotropin receptor mutations as a tool to understand thyrotropin receptor action. *J Mol Med (Berl)*. 2001; 79 (12): 707-721.
- Wonerow P, Schöneberg T, Schultz G, Gudermann T, Paschke R. Deletions in the third intracellular loop of the thyrotropin receptor. A new mechanism for constitutive activation. *The Journal of biological chemistry*. 1998; 273 (14): 7900-7905.
- Xing M. Oxidative stress: a new risk factor for thyroid cancer. *Endocrine-related cancer*. 2012; 19 (1): C7-11.
- Xing M, Usadel H, Cohen Y, Tokumaru Y, Guo Z, Westra WB, Tong BC, et al. Methylation of the thyroid-stimulating hormone receptor gene in epithelial thyroid tumors: a marker of malignancy and a cause of gene silencing. *Cancer research*. 2003; 63 (9): 2316-2321.
- Yanagita Y, Okajima F, Sho K, Nagamachi Y, Kondo Y. An adenosine derivative cooperates with TSH and Graves' IgG to induce Ca²⁺ mobilization in single human thyroid cells. *Molecular and cellular endocrinology*. 1996; 118 (1-2): 47-56.
- Yang J, Rothermel B, Vega RB, Frey N, McKinsey TA, Olson EN, Bassel-Duby R, et al. Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. *Circulation research*. 2000a; 87 (12): E61-68.
- Yang Q, Rasmussen SA, Friedman JM. Mortality associated with Down's syndrome in the USA from 1983 to 1997: a population-based study. *Lancet*. 2002; 359 (9311): 1019-1025.
- Yang SA, Klee CB. Low affinity Ca²⁺-binding sites of calcineurin B mediate conformational changes in calcineurin A. *Biochemistry*. 2000b; 39 (51): 16147-16154.
- Yang TT, Chow CW. Transcription cooperation by NFAT.C/EBP composite enhancer complex. *The Journal of biological chemistry*. 2003; 278 (18): 15874-15885.
- Yang XY, Wang LH, Chen T, Hodge DR, Resau JH, DaSilva L, Farrar WL. Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT. *The Journal of biological chemistry*. 2000c; 275 (7): 4541-4544.
- Yano Y, Kamma H, Matsumoto H, Fujiwara M, Bando H, Hara H, Yashiro T, et al. Growth suppression of thyroid cancer cells by adenylcyclase activator. *Oncology reports*. 2007; 18 (2): 441-445.
- Yeromin AV, Zhang SL, Jiang W, Yu Y, Safrina O, Cahalan MD. Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature*. 2006; 443 (7108): 226-229.
- Yiu GK, Kaunisto A, Chin YR, Toker A. NFAT promotes carcinoma invasive migration through glypican-6. *The Biochemical journal*. 2011; 440 (1): 157-166.

- Yiu GK, Toker A. NFAT induces breast cancer cell invasion by promoting the induction of cyclooxygenase-2. *The Journal of biological chemistry*. 2006; 281 (18): 12210-12217.
- Youn HD, Chatila TA, Liu JO. Integration of calcineurin and MEF2 signals by the coactivator p300 during T-cell apoptosis. *The EMBO journal*. 2000; 19 (16): 4323-4331.
- Zhang SL, Yu Y, Roos J, Kozak JA, Deerinck TJ, Ellisman MH, Stauderman KA, et al. STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. *Nature*. 2005; 437 (7060): 902-905.
- Zhao P, Xiao X, Kim AS, Leite MF, Xu J, Zhu X, Ren J, et al. c-Jun inhibits thapsigargin-induced ER stress through up-regulation of DSCR1/Adapt78. *Experimental biology and medicine*. 2008; 233 (10): 1289-1300.
- Zielke A, Hoffmann S, Plaul U, Duh QY, Clark OH, Rothmund M. Pleiotropic effects of thyroid stimulating hormone in a differentiated thyroid cancer cell line. Studies on proliferation, thyroglobulin secretion, adhesion, migration and invasion. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 1999; 107 (6): 361-369.

8 Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1:	Anatomie der humanen Schilddrüse	5
Abb. 3.2:	Schilddrüsenfollikel	6
Abb. 3.3:	Strukturmodell des humanen Thyreotropins (TSH).....	7
Abb. 3.4:	Hypothalamus-Hypophyse Regelkreislauf.....	8
Abb. 3.5:	Sekundärstruktur eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (GPCR)	10
Abb. 3.6:	Aktivierungsschema eines heterotrimeren G-Proteins.....	11
Abb. 3.7:	Strukturmodell des humanen Thyreotropin-Rezeptors (TSH-R)	15
Abb. 3.8:	Erneutes Strukturmodell für einen Teil der extrazellulären Domäne des humanen Thyreotropin-Rezeptors (TSH-R)	16
Abb. 3.9:	Übersicht zu Thyreotropin-Rezeptor (TSH-R)-induzierten Signalwegen nach Aktivierung verschiedener G-Proteine	18
Abb. 3.10:	Primäre Struktur der Calcium-regulierten NFAT Proteine	26
Abb. 3.11:	Schematische Darstellung der NFAT-Regulation.....	29
Abb. 3.12:	Das humane <i>RCAN1</i> -Gen.....	33
Abb. 3.13:	Enzymatische Aktivität von Cox-2 im Arachidonsäurestoffwechsel	34
Abb. 3.14:	Struktur von humanem Metallothionein	36
Abb. 4.1:	Schematische Darstellung der RNA-Interferenz (RNAi)	56
Abb. 4.2:	Fluoreszenzintensität von Fura-2	69
Abb. 4.3:	Exemplarische Graphen einer Fura-2 Messung	70
Abb. 4.4:	Firefly-Luciferase-katalysierte Umsetzung des Luciferins in einer Biolumineszenzreaktion	74
Abb. 4.5:	<i>Renilla</i> -Luciferase-katalysierte Umsetzung des Coelenterazins in einer Biolumineszenzreaktion	75
Abb. 4.6:	Nachweisreaktion zur Bestimmung der Zellproliferation mittels XTT ..	78
Abb. 4.7:	Boyden-Chamber Migrationstest	82
Abb. 5.1:	cAMP-Akkumulation in FTC 133 wt TSH-R und HTC 238 Zellen nach Stimulation TSH oder Forskolin	86
Abb. 5.2:	ERK 1/2-Phosphorylierung in follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien nach Stimulation mit TSH oder FCS	87
Abb. 5.3:	Intrazelluläre Calciumionenkonzentration in follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien nach Stimulation mit TSH.....	89
Abb. 5.4:	mRNA-Expression der Calcium/Calcineurin-abhängigen NFAT-Varianten in FTC 133 wt TSH-R Zellen.....	91
Abb. 5.5:	Expression der Proteine NFATc1, NFATc2 und NFATc3 in FTC 133 wt TSH-R Zellen sowie in einer Positivkontrolle.....	92
Abb. 5.6:	Subzelluläre Lokalisation von NFATc1 und NFATc2 in unstimulierten FTC 133 wt TSH-R Zellen.....	94

Abb. 5.7:	Subzelluläre Lokalisation von NFATc3 in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit Ionomycin	95
Abb. 5.8:	Subzelluläre Lokalisation des NFATc3-eGFP Fusionsproteins in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit A23187 oder TSH.....	97
Abb. 5.9:	NFAT-abhängige Reporterogenaktivität in FTC 133 wt TSH-R Zellen...	98
Abb. 5.10:	Expression von Autotaxin mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit TSH.....	100
Abb. 5.11:	Expression von VEGF-A, -B und -C mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit TSH.....	101
Abb. 5.12:	Expression von c-Myc mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit TSH.....	102
Abb. 5.13:	Expression von c-Myc mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition von Calcineurin und Stimulation mit TSH	103
Abb. 5.14:	Expression von c-Myc mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition von MEK und Stimulation mit TSH	104
Abb. 5.15:	Expression von RCAN1 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit TSH.....	105
Abb. 5.16:	Expression von RCAN1.1 und RCAN1.4 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit TSH.....	106
Abb. 5.17:	Expression des Proteins RCAN1 in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit TSH.....	107
Abb. 5.18:	Expression von RCAN1 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition von Calcineurin und Stimulation mit TSH	108
Abb. 5.19:	Expression des Proteins RCAN1 in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition von Calcineurin und Stimulation mit TSH	109
Abb. 5.20:	Expression von RCAN1 mRNA und Protein in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition von NFAT und Stimulation mit TSH	110
Abb. 5.21:	Expression von RCAN1 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit Forskolin.....	111
Abb. 5.22:	Expression des Proteins RCAN1 in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition der Proteinkinase A und Stimulation mit TSH oder Forskolin	112
Abb. 5.23:	Expression von RCAN1 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition von G _i -Proteinen und Stimulation mit TSH.....	112
Abb. 5.24:	Expression des Proteins RCAN1 in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition von G _i -Proteinen und Stimulation mit TSH oder Thapsigargin	113
Abb. 5.25:	Expression von Gα _q und Gα ₁₁ mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen Gα _q oder Gα ₁₁	114
Abb. 5.26:	Expression von RCAN1 und RCAN1.4 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen Gα _q oder Gα ₁₁ und Stimulation mit TSH.....	115
Abb. 5.27:	Expression von Gα _q und Gα ₁₁ mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Doppeltransfektion mit siRNA gegen Gα _q sowie Gα ₁₁	116

Abb. 5.28:	Expression von RCAN1 und RCAN1.4 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Doppeltransfektion mit siRNA gegen $G\alpha_q$ sowie $G\alpha_{11}$ und Stimulation mit TSH	117
Abb. 5.29:	Expression von RCAN1 und RCAN1.4 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Doppeltransfektion mit siRNA gegen $G\alpha_q$ sowie $G\alpha_{11}$ und Stimulation mit Ionomycin	118
Abb. 5.30:	Expression des Proteins RCAN1 in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Doppeltransfektion mit siRNA gegen $G\alpha_q$ sowie $G\alpha_{11}$ und Stimulation mit TSH oder Ionomycin	119
Abb. 5.31:	Expression von RCAN1 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit Ionomycin oder Thapsigargin	120
Abb. 5.32:	Intrazelluläre Calciumionenkonzentration von FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit TSH in Calciumionen-freier Umgebung	122
Abb. 5.33:	Expression von RCAN1 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen bei verschiedenen extrazellulären Calciumionenkonzentrationen und Stimulation mit TSH	123
Abb. 5.34:	Einstrom bivalenter Kationen in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit TSH	125
Abb. 5.35:	Expression des Proteins RCAN1 in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition von STIM1 und Stimulation mit TSH.....	126
Abb. 5.36:	Expression von c-Fos und c-Jun mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit TSH.....	127
Abb. 5.37:	Expression von RCAN1 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition von MEK und Stimulation mit TSH.....	128
Abb. 5.38:	Expression von RCAN1 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition der Gentranslation und Stimulation mit TSH.....	129
Abb. 5.39:	Expression des Proteins c-Fos in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition der Gentranslation und Stimulation mit TSH.....	130
Abb. 5.40:	Expression von RCAN1.1 sowie RCAN1.4 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen RCAN1 und Stimulation mit TSH	131
Abb. 5.41:	Expression des Proteins RCAN1 in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen RCAN1 und Stimulation mit TSH.....	132
Abb. 5.42:	Analyse der Zellproliferation von FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen RCAN1 und Stimulation mit TSH.....	133
Abb. 5.43:	Analyse der Koloniebildungsfähigkeit von FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen RCAN1 und Stimulation mit TSH	134
Abb. 5.44:	Analyse der Zellmigration von FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen RCAN1 und Stimulation mit TSH.....	136
Abb. 5.45:	Expression von RCAN1 mRNA in RO82-W-1 Zellen nach Stimulation mit TSH.....	137
Abb. 5.46:	Expression von RCAN1.1 und RCAN1.4 mRNA in RO82-W-1 Zellen nach Stimulation mit TSH.....	138

Anhang

Abb. 5.47:	Expression des Proteins RCAN1 in RO82-W-1 Zellen nach Stimulation mit TSH	139
Abb. 5.48:	Expression des Proteins RCAN1 in RO82-W-1 Zellen unter Inhibition von Calcineurin und Stimulation mit TSH	140
Abb. 5.49:	Expression des Proteins RCAN1 in RO82-W-1 Zellen unter Inhibition von NFAT und Stimulation mit TSH	141
Abb. 5.50:	Expression von $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ mRNA in RO82-W-1 Zellen nach Doppeltransfektion mit siRNA gegen $G\alpha_q$ sowie $G\alpha_{11}$	142
Abb. 5.51:	Expression von RCAN1 und RCAN1.4 mRNA in RO82-W-1 Zellen nach Doppeltransfektion mit siRNA gegen $G\alpha_q$ sowie $G\alpha_{11}$ und Stimulation mit TSH	142
Abb. 5.52:	Expression des Proteins RCAN1 in RO82-W-1 Zellen nach Doppeltransfektion mit siRNA gegen $G\alpha_q$ sowie $G\alpha_{11}$ und Stimulation mit TSH	143
Abb. 5.53:	Expression des Proteins RCAN1 in RO82-W-1 Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen RCAN1 und Stimulation mit TSH oder Ionomycin	144
Abb. 5.54:	Analyse der Zellproliferation von RO82-W-1 Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen RCAN1 und Stimulation mit TSH	145
Abb. 5.55:	Expression von Thyreotropin-Rezeptor (TSH-R) mRNA in follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien	147
Abb. 5.56:	Expression von Cox-2 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit TSH	148
Abb. 5.57:	Expression des Proteins Cox-2 in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit TSH	149
Abb. 5.58:	Expression von Cox-2 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition von Calcineurin und Stimulation mit TSH	150
Abb. 5.59:	Expression des Proteins Cox-2 in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition von Calcineurin und Stimulation mit TSH	151
Abb. 5.60:	Expression von Cox-2 mRNA und des Proteins Cox-2 in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition von NFAT und Stimulation mit TSH	152
Abb. 5.61:	Expression von Cox-2 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Doppeltransfektion mit siRNA gegen $G\alpha_q$ sowie $G\alpha_{11}$ und Stimulation mit TSH	153
Abb. 5.62:	Expression des Proteins Cox-2 in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Doppeltransfektion mit siRNA gegen $G\alpha_q$ sowie $G\alpha_{11}$ und Stimulation mit TSH oder Ionomycin	154
Abb. 5.63:	Expression von Cox-2 mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition der Gentranslation und Stimulation mit TSH	155
Abb. 5.64:	Expression von MT1X mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit TSH	156
Abb. 5.65:	Expression von MT1X mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Doppeltransfektion mit siRNA gegen $G\alpha_q$ sowie $G\alpha_{11}$ und Stimulation mit TSH	157

Abb. 5.66:	Expression von MT1X mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit Ionomycin oder PMA.....	158
Abb. 5.67:	Intrazelluläre Calciumionenkonzentration in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit ATP, Bradykinin, Carbachol oder Somatostatin	159
Abb. 5.68:	Expression von MT1X mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit ATP, Bradykinin, Carbachol oder Somatostatin.....	160
Abb. 5.69:	Expression von MT1X mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen nach Stimulation mit Forskolin	161
Abb. 5.70:	Expression von MT1X mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition der Proteinkinase A und Stimulation mit TSH oder Forskolin	162
Abb. 5.71:	Expression von MT1X mRNA in FTC 133 wt TSH-R Zellen unter Inhibition von MEK und Stimulation mit TSH.....	163
Abb. 5.72:	Expression von MT1X mRNA in primären Thyreozyten nach Stimulation mit TSH oder Ionomycin.....	164
Abb. 5.73:	Expression von MT1X mRNA in SD 171 Zellen unter Inhibition der Proteinkinase C und Stimulation mit TSH.....	165
Abb. 6.1:	Übersicht zu beteiligten Signalmolekülen bei der TSH-induzierten NFAT-Aktivierung und folgenden Expression von RCAN1.4 und Cox-2	185
Abb. 6.2:	Übersicht zu beteiligten Signalmolekülen bei der TSH- und Forskolin-induzierten Expression von MT1X	190

Tabellenverzeichnis

Tab. 4.1:	Kultivierung der einzelnen Zelllinien.....	52
Tab. 4.2:	Verwendete Primärantikörper sowie ihre Verdünnungen beim Western Blot	61
Tab. 4.3:	Verwendete Primärantikörper sowie ihre Verdünnungen bei immuncytochemischen Analysen	63

Abkürzungsverzeichnis

A	A	Adenin
	AA	Arachidonsäure
	AC	Adenylylcyclase
	Ago	Proteine der Argonaute-Familie
	AMP	Adenosin-Monophosphat
	ANOVA	Varianzanalyse; engl.: „analysis of variance“
	AP-1	Aktivator Protein 1
	APS	Ammoniumperoxodisulfat
	ATP	Adenosintriphosphat
	BAPTA	(1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure)
B	BIM	Bisindolylmaleinimid
	BK	Bradykinin
	BP	Bindungspartner
	BSA	Rinderserum-Albumin
	C	Cytosin
C	°C	Grad Celsius
	Ca ²⁺	Calciumionen
	[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Calciumionenkonzentration
	[Ca ²⁺] _{ex}	extrazelluläre Calciumionenkonzentration
	CAM	Calmodulin
	cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
	CaN	Calcineurin
	CB	Calcineurin Bindungsstelle
	CCh	Carbachol
	cDNA	komplementäre DNA; engl.: „copy DNA“/ „complementary DNA“
	C/EBP	engl.: „CCAAT/enhancer-binding-protein“
	CK	Casein Kinase
	CnA	Calcineurin Untereinheit A
	CnB	Calcineurin Untereinheit B
	CNG-Kanäle	durch zyklische Nukleotide geöffnete Ionenanäle, engl.: „cyclic nucleotide-gated ion channel“
	Cox-2	Cyclooxygenase 2
	CP	Crossing Point
	CRAC	engl.: „calcium release-activated channel“

Anhang

	CREB	cAMP-responsible Element Bindeprotein; engl.: „cAMP-response element binding protein“
	CsA	Cyclosporin A
	C-Terminus	Carboxy-Terminus
	CyHex	Cycloheximid
D	Da	Dalton
	DAG	Diazylglycerol
	DBR	DNA-bindende Region
	DEPC	Diethylpyrocarbonat (ethoxycarbonyl ethyl carbonate)
	DMSO	Dimethylsulfoxid (methylsulfinylmethylmethane)
	DNA	Desoxyribonukleinsäure
	ds	doppelsträngig
	DSCR1	engl.: „down syndrome critical/candidate region 1“
	DTT	1,4-Dithiothreitol
	DYRK	Dual-spezifische Tyrosin Phosphorylierungs-regulierte Kinase
E	e	extrazellulär
	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (2-[2-(bis(carboxymethyl)amino)acetic acid])
	eGFP	verbessertes GFP; engl.: „enhanced GFP“
	EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure (2-[2-[2-[2-bis(carboxymethyl)amino)ethoxy]ethoxy]ethyl-(carboxymethyl)amino]acetic acid)
	[EGTA] _{ex}	Extrazelluläre EGTA-Konzentration
	ER	endoplasmatisches Retikulum
	ERK	extrazelluläre Signal-regulierte Kinase
F	FCS	fötales Kälberserum; engl.: „fetal calf serum“
	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
	FK 506	Tacrolimus
	FSH	Follitropin/Follikel-stimulierende Hormon
	FSK	Forskolin
	Fura-2/AM	Fura-2-acetoxymethylester
G	g	1. Erdbeschleunigung; engl.: gravity; 2. Gramm
	G	Guanin
	G α	α -Untereinheit des G-Proteins
	G $\beta\gamma$	$\beta\gamma$ -Komplex des G-Proteins
	GAP	GTPase-aktivierendes Protein

Anhang

	GATA	GATA-bindender Faktor
	GDP	Guanosindiphosphat
	GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor; engl.: „guanine nucleotide exchange factor“
	GFP	grün fluoreszierendes Protein; engl.: „green fluorescent protein“
	GITC	Guanidinisothiocyanat
	GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor; engl.: „G-protein coupled receptor“
	GPR54	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 54
	G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
	GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
	GSK3	Glykogen Synthase Kinase 3
	GTP	Guanosintriphosphat
H	h	Stunde
	HBS	engl.: „HEPES buffered saline“
	hCG	humanes Choriongonadotropin
	HEPES	(2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure)
	HRP	Meerrettich-Peroxidase; engl.: horse radish peroxidase
	HUVEC	humane Zellen aus dem Endothel von Nabelschnurvenen; engl.: „human umbilical vein endothelial cells“
I	i	intrazellulär
	¹³¹ I	radioaktives Iodisotop
	IBMX	3-Isobutyl-1-methylamin
	ICC	Immunzytochemie
	IgG	Immunglobulin G
	IL-2	Interleukin 2
	Iono	Ionomycin
	IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
K	k	Kilo-
	K _{eh}	Erhaltungskinese
	K _{ex}	Exportkinese
L	l	Liter
	LH	Lutropin/luteinisierendes Hormon
	LRR	leucinreiche Wiederholungen; engl.: „leucine-rich repeats“
M	μ	Mikro-
	m	1. Milli-, 2. Meter

Anhang

	M	Molar
	MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
	MCIP1	engl.: „modulatory calcineurin interacting protein 1“
	MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase
	min	Minute
	mRNA	Boten RNA; engl.: „messenger RNA“
	MT	Metallothionein
N	n	Nano-
	NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrit
	NES	nukleäre Exportsequenz
	NFAT	nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen; engl.: „nuclear factor of activated T cells“
	NHR	NFAT Homologie Region
	NIS	Natrium-Iodid-Symporter
	n. n.	nicht nachweisbar
	NLS	nukleäre Lokalisationssequenz
	n. s.	nicht signifikant
	N-Terminus	Amino-Terminus
O	O ₂	Sauerstoff
	OD	optische Dichte
P	PBS	engl.: „phosphate buffered saline“
	PCR	Polymerase Kettenreaktion; engl.: „polymerase chain reaction“
	PG	Prostaglandin
	PGI ₂	Prostacyclin
	PG Syn.	Prostaglandin Synthase
	PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
	PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
	PKA	Proteinkinase vom Typ A
	PKC	Proteinkinase vom Typ C
	PLC	Phospholipase C
	PLCβ	Phospholipase Cβ
	PLCγ	Phospholipase Cγ
	PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
	PTX	Pertussis Toxin
Q	qPCR	quantitative RT-PCR

X

Anhang

R	RCAN1	Regulator von Calcineurin 1
	RGS	Regulator des G-Protein Signallings; engl.: „regulator of G protein signalling“
	RHR	Rel Homologie Region
	RISC	engl.: „RNA-induced-silencing-complex“
	RLU	relative Lichteinheiten; engl.: „relative light units“
	RNA	Ribonukleinsäure
	RNAi	RNA Interferenz
	ROK	Rho-Kinase
	ROS	reaktive Sauerstoffspezies
	RT	reverse Transkriptase
	RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
S	s	Sekunde
	SD	Standardabweichung; engl.: „standard deviation“
	SDS	Natriumdodecylsulfat; engl.: „sodium dodecyl sulfate“
	SDS-PAGE	engl.: „sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel-electrophoresis“
	SERCA	Calciumionenpumpe des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums; engl.: „sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase“
	siRNA	engl.: „short interfering RNA“
	SOC	Speicher-operierte Ionenkanäle
	SOCE	Calciumioneneinstrom über Speicher-operierte Kanäle; engl.: „store-operated Ca ²⁺ entry“
	SP	Serin- und Prolin-reiche Region
	SRR	Serin-reiche Region
	ss	einzelsträngig
	Sst	Somatostatin
T	STIM	engl.: „sensor stromal interaction molecule“
	T	Thymin
	T ₃	Triiodthyronin
	T ₄	Thyroxin
	TAD	Transaktivierungsdomäne
	TBS	engl.: „tris buffered saline“
	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
	Tg	Thyreoglobulin
	TG	Thapsigargin

Anhang

	TM	transmembranäre Domäne
	TPO	Thyreoperoxidase
	TRH	Thyreoliberin/ Thyreotropin freisetzendes Hormon; engl.: „thyreotropin releasing hormone“
	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (2-amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol)
	TRP	engl.: „transient receptor potential“
	TSH	Thyreotropin/Thyreoidea-Stimulierendes Hormon
	TSH-R	TSH Rezeptor
	TXA ₂	Thromboxan
U	U	Uracil
V	VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor; engl.: „vascular endothelial growth factor“
	VGCC	Spannungs-gesteuerter Ca ²⁺ -Kanal; engl.: „voltage-gated-Ca ²⁺ -channel“
W	w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit; engl.: „weight/volume“
	wt	Wildtyp
X	XTT	2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide
Z	ZK	Zellkern

Aminosäurenverzeichnis

Aminosäure	Dreibuchstaben-Code	Einbuchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure/Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure/Glutamat	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten:

Grzelinski M, Pinkenburg O, Büch T, Gold M, **Stohr S**, Kalwa H, Gudermann T, Aigner A.

Critical role of G(alpha)12 and G(alpha)13 for human small cell lung cancer cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo.

Clin Cancer Res. 2010 Mar 1;16(5):1402-15.

Schaefer EA, **Stohr S**, Meister M, Aigner A, Gudermann T, Buech TR.

Stimulation of the chemosensory TRPA1 cation channel by volatile toxic substances promotes cell survival of small cell lung cancer cells.

Biochem Pharmacol. 2013 Feb 1;85(3):426-38.

Bäck CM, **Stohr S**, Schäfer EA, Biebermann H, Boekhoff I, Breit A, Gudermann T, Büch TR.

TSH induces metallothionein 1 in thyrocytes via G_{q/11}- and PKC-dependent signaling.

J Mol Endocrinol. 2013 Jun 4;51(1):79-90.

Publizierte Kongressbeiträge:

E. A. M. Schäfer, **S. Stohr**, H. Kalwa, A. Breit, T. R. H. Büch and T. Gudermann.

Cellular responses of small cell lung cancer cells upon allyl isothiocyanate stimulation.

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 2009 Apr: 379(142): 33-33

S. Stohr, E. A. M. Schäfer, T. Gudermann and T. R. H. Büch.

NFAT-dependent TSH signaling in thyroid carcinoma cells.

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 2010 Mar: 381(1): 33-34

E. A. M. Schäfer, **S. Stohr**, L. Sytik, T. Gudermann, and T. R. H. Büch.

Isothiocyanate-promoted signaling in small cell lung cancer cells: Delineation of calcium-dependent and -independent effects.

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 2010 Mar: 381(1): 33-33

S. Stohr, E. A. M. Schäfer, T. R. H. Büch and T. Gudermann.

Thyrotropin (TSH)-promoted induction of Dscr1 in thyroid carcinoma cells via calcineurin and NFAT signaling.

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 2011 Mar: 383(1): 68-68

E. A. M. Schäfer, T. R. H. Büch, M. Hauswald, **S. Stohr**, T. Gudermann and A. Aigner.

Growth regulation in small cell lung cancer via $G_{(q/11)}$ - and $G_{(12/13)}$ -dependent signaling.

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 2012 Mar: 385(1): 79-79

S. Stohr, H. Mückter, D. Steinritz, T. Gudermann, T. R. H. Büch

Thyrotropin receptor (TSH-R) signalling in thyroid cancer: $G_{q/11}$ -dependent induction of RCAN1 via calcineurin/NFAT

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 2013 Mar: 337(1): 82-82

Eidesstattliche Versicherung

Stohr, Stefanie

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Charakterisierung cAMP-unabhängiger Effektoren des Thyreotropin-Rezeptors in humanen Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. Thomas Gudermann für die Möglichkeit danken, an seinem Institut promovieren zu können.

Bei meinem Doktorvater, PD Dr. Dr. Harald Mückter, bedanke ich mich sehr herzlich für die großartige Betreuung und Zusammenarbeit während meiner Dissertation sowie seine tatkräftige Unterstützung. Vor allem in der letzten Phase meiner Doktorarbeit wusste ich nicht, was ich ohne ihn hätte tun sollen. Danke!

Für ihre Mühe bei der Begutachtung dieser Arbeit möchte ich mich im Voraus bei meinen Gutachtern bedanken, die mir noch nicht bekannt sind und die ich daher leider nicht namentlich erwähnen kann.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Thomas Büch für seine umfassende Unterstützung und Förderung dieser Arbeit mit wertvollen Anregungen und Ratschlägen, für seine Diskussionsbereitschaft sowie für die gute menschliche und fachliche Zusammenarbeit. Danke auch für Unternehmungen außerhalb des Instituts, vor allem für unsere vielzähligen und lustigen Koch-Abende.

Meiner Laborkollegin Eva Schäfer danke ich sehr für die freundschaftliche Zusammenarbeit und einen angenehmen Laboralltag. Darüber hinaus danke ich ihr für die Hilfe bei der Wohnungssuche, viele persönliche Gespräche und die (mal mehr, mal weniger erfolgreichen) Shopping-Touren.

Bei allen anderen ehemaligen Mitarbeitern der „AG Büch“, Veronika Deák, Christina Berr, Anja Walkam, Maria „SchuSchu“ Radtke und Elisabeth Topoll, möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken. Es war eine schöne Zeit mit Euch! Vroni und Anja, Ihr wart die besten Praktikantinnen, die man sich wünschen konnte, außerdem bedanke ich mich für eure Dienste als studentische Hilfskräfte.

Ein großes Dankeschön auch allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Erdgeschosses im Walther-Straub-Institut für ihre Hilfe und Unterstützung sowie das gute Arbeitsklima.

Anhang

Dr. Andreas Breit und PD Dr. Ingrid Boekhoff möchte ich außerdem für wissenschaftliche Diskussionen sowie ihren Einsatz als „Ersatzbetreuer“ danken.

Ellen Damm danke ich für die vielen Einladungen zu Geburtstagen, zum Fußballbellschauen und zum Robby Williams Konzert, für das sichere nach Hause bringen und natürlich besonders für das Korrekturlesen der Arbeit.

Bei Jürgen Solinski bedanke ich mich für hilfreiche fachliche Anregungen, die eGFP-markierten NFAT-Konstrukte, seine stetige Hilfsbereitschaft sowie Geburtstagsfeiern mit Wacholder.

Den „Spermien-Mädels“ Dorke Meyer, Heike Borth, Nele Zitranski, Andrea Wartenberg, Lilli Arndt und Elli Arlt ein riesengroßes Dankeschön für ihre Hilfsbereitschaft, unzählige fachliche und persönliche Gespräche, nette Mittags- und Kaffeepausen mit leckerem Kuchen, das Mithelfen und Organisieren von Weihnachtsfeiern, Sommerfesten und und und... Heike Borth danke ich außerdem für ihre Hilfe und Unterstützung bei der Immunzytochemie.

Danke an Dr. Dirk Steinritz und Dr. Annette Schmidt für ihre Kooperation bei den Boyden-Chamber Migrationsstudien.

Besonders bedanke ich mich bei Veronika Hampl für ihre Freundschaft, fachliche und persönliche Gespräche, stetige Aufmunterungen sowie viele Unternehmungen. Danke an dich und Maria Drexler auch für große und kleine Kaffeepausen sowie das gemeinsame Schwimmen.

Auch allen hier nicht namentlich aufgeführten Mitarbeitern des Walther-Straub-Instituts möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Mein größter Dank aber gilt meinem Freund Jan sowie meinen Eltern und Schwestern. Auf euch konnte ich mich jederzeit und in jeder Lebenslage verlassen, ich danke euch für alles!